

LA REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Saad Dahlab, Blida1



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du diplôme de MASTER

Spécialité : Chimie Appliquée

Présenté par :

Allout Imene

&

Mesnadi N- EL Houda



***Contribution à l'étude de la synergie
dans l'action antibactérienne de
l'oxytétracycline et le lysozyme à l'état
encapsulés***



Sous la direction de professeur : Mr Y. Bal

Mémoire présenté le 03/10/2019 devant des jurys :

Président jury : Mr R. Belal

Pr Université de Blida.

1^{er} Examinatrice : Mme N. Hachach.

MAA Université de Blida.

2^{er} Examineur : Mr L. Bouamerane

MCB Université de Khemis Melyana.

Année universitaire: 2018/2019

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement Mr Y. Bal qui nous a permis de bénéficier de son encadrement. Les conseils qu'il nous a prodigué, la patience, la confiance qu'il nous a témoignés ont été déterminants dans la réalisation de notre travail de recherche.

Nous voudrions remercier Professeur R. Belal et Y. Bal pour nous avoir accueillies dans le laboratoire LPCMM et d'avoir mis à notre disposition le matériel nécessaire pour la réalisation de ce mémoire. Nous les exprimons également notre gratitude la plus sincère.

Nos vifs remerciements s'adressent à tous les ingénieurs et les techniciens du laboratoire pédagogique et de LPCMM pour leur aide permanente.

Aux responsables et aux personnels SAIDAL ANTIBIOTICAL de Médéa qui par leur compréhension et leur aide, on a pu accomplir notre travail de recherche. Au membre de jury qui ont bien voulu consacrer une partie de leurs temps afin de juger ce travail.

Mr R. Belal pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de notre Soutenance.

Mm Hachach pour l'honneur qu'elle nous a accordé en acceptant d'examiner notre mémoire.

Mr Bouamerane pour l'honneur qu'il nous a accordé en acceptant d'examiner notre mémoire.

A tous Les collègues de la promotion chimie appliqué 2018-2019 pour les sympathiques moments qu'on a passés ensemble.

Nos remerciements s'étendent également à tous nos enseignants durant les années des études.



A nos familles et nos amis qui par leurs prières et leurs encouragements, on a pu surmonter tous les obstacles.

Enfin un énorme Merci à tous ceux qui nous ont aidé, conseillé, et ouvert leurs portes, parfois même avec un sourire, et qui se reconnaîtront certainement.



Dédicace

Je dédie ce travail à :

Tous ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles Et à ceux qui je dois tant.

A mes chers parents, Autant de phrases et d'expressions ne sauraient exprimer ma gratitude. Vos conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Votre patience sans fin, votre compréhension et votre encouragement sont pour moi le soutien indispensable que vous avez toujours su m'apporter.

A Mes chers grands-parents (paternelle et maternel) Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.

- *A mes chères sœurs et frères*
- *A Mes amis et en particulier à ma très chères amie H .Medjdoul pour tous les bons moments que nous avons partagés.*
- *A Tous les membres de ma famille surtout mes tantes*
- *Enfin, à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.*

Imene



Résumé

INTRODUCTION GENERALE 1**Chapitre I : étude bibliographique****I.1 Les antibiotiques..... 3****I.2 La molécule d'oxytétracycline..... 3**

I.2.1 Caractéristiques et propriétés physico-chimiques..... 4

I.2.2 Activité antibactérienne 5

I.2.2.1 Spectres d'activité..... 5

I.2.2.2 Mode d'action..... 5

I.2.3 Indication de l'oxytétracycline 7

I.3 Composition chimique de blanc d'œuf 7

I.3.1 Le Lysozyme..... 8

I.3.1.1 Structure 8

I.3.1.2 Fonctions du lysozyme..... 10

I.4 Microencapsulation 10

I.4.1 Définition 10

I.4.2 Historique..... 11

I.4.3 Classification des microparticules 11

I.4.4 Composition habituelle des microparticules :..... 12

I.4.5 Méthodes d'encapsulation 14

I.4.5.1 Procédés chimiques 14

I.4.5.2 Procédés physico-mécaniques 14

I.4.5.3 Procédés physico-chimiques..... 15

I.4.6 Microencapsulation par coacervation complexe..... 15

I.4.7 Microencapsulation par coacervation simple..... 16

I.4.8 Application de la microencapsulation..... 16

I.4.9 Objectifs de la microencapsulation 18

I.4.10 Libération contrôlée d'un principe actif..... 18

I.4.10.1 Mécanismes de la libération contrôlée..... 19

I.4.10.2 Paramètres influençant la libération d'un PA..... 21

I.4.10.3 Profil de libération 22

Chapitre II : partie expérimentale**II.1 Matériels et méthodes 23**

II.1.1 Introduction	23
II.1.2 Testes organoleptiques habituels.....	23
II.1.2.1 Aspects.....	23
II.1.2.2 pH	23
II.1.2.3 Solubilité.....	23
II.1.3 Caractérisation spectroscopique	23
II.1.3.1 Dosages.....	24
II.1.4 Extraction du lysozyme à partir de l'œuf de poule	24
II.1.4.1 Dosage des protéines selon la méthode de Bradford.....	24
II.1.5 Préparation et caractérisation des microcapsules	25
II.1.5.1 Méthode de caractérisation et d'analyses des microcapsules :.....	26
II.1.5.2 Etude sur la libération de l'oxytétracycline et du lysozyme in vitro :	27
II.1.6 Préparation d'un onguent :	28
II.1.7 Analyse microbiologique	29
II.2 Résultats et discussion.....	30
II.2.1 Caractérisation de base	30
II.2.2 Caractérisation spectroscopique	30
II.2.2.1 Caractérisation spectroscopique dans l'UV-Vis.....	30
II.2.2.2 Caractérisation spectroscopique dans l'IR	32
II.2.3 Extraction du lysozyme d'œuf de poule :	34
II.2.3.1 Dosage des protéines par la méthode de Bradford :	36
II.2.4 Préparation des microcapsules	39
II.2.5. Evaluation de l'activité antibactérienne	43
II.2.5.4 Résultats de la libération de l'oxytétracycline et du lysozyme :	48
II.2.6 Préparation et caractérisation microbiologique d'un onguent à base de capsules actives :	51
CONCLUSION GENERALE.....	53

ANNEXE**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

La microencapsulation selon une méthode de coacervation complexe de l'oxytétracycline qui est un antibiotique connu à large spectre d'action et le lysozyme qui est un enzyme possédant aussi un effet antibactérien est abordée dans ce mémoire. L'effet synergique de l'action de ces deux agents est analysé sur des souches microbiennes standard comme les *Staphylococcus aureus* et *éperdimidis* et *l'Escherichia Coli*. Par analyse spectroscopique (FT-IR) il a été démontré que le coacervat formant la microcapsule était un complexe polymérique formé entre la gélatine et l'alginate dans des conditions appropriées. En outre, des études cinétiques montraient que les principes actifs pouvaient diffuser à travers la membrane polymérique dans des milieux biologiques simulés avec des vitesses acceptables ; ceci constitue un gage important dans l'éventuelle application des microcapsules fabriquées pour des applications pharmaceutiques ou parapharmaceutiques.

Mots clés : microencapsulation, coacervation, microcapsules, antibiotique Oxytétracycline, antibiotique lysozyme, synergie, activité...



نتناول في هذه الدراسة الكبسلة الدقيقة وفقاً لطريقة التقوُّص المَعقَّدة للأوكسيتراسيكلين وهو مضاد حيوي معروف له طيف واسع من النشاط والليزوزيم، وهو إنزيم له أيضاً تأثير مضاد للجراثيم. يتم تقييم التأثير التآزري لعمل هذين العاملين على السلالات الميكروبية القياسية مثل المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*) والابريديميس والإشريكية القولونية (*Escherichia coli*). من خلال التحليل الطيفي للأشعة تحت الحمراء تم إظهار ان القوصرة المشكَّلة للميكروكابسول كان مجمع البوليمر يخرج بين الجيلاتين والالجينات، في ظل الظروف الحالية بالإضافة إلى ذلك، الدراسات الحركية بينت أن المكونات النشطة يمكن أن تنتشر عبر الغشاء البوليمري في الوسائط البيولوجية المحاكية بنسب مقبولة وهذا يشكل نتيجة مهمَّة في التطبيق المحتمل للكبسولات الدقيقة المصنَّعة في الميادين الصيدلانية أو الشبه الصيدلانية.

الكلمات المفتاحية: الكبسلة، قوصرة، الكريات الدقيقة، الأوكسيتراسيكلين، المضادات الحيوية، الليزوزيم، التآزر، النشاط.



Microencapsulation according to a complex Coacervation method of oxytetracycline which is a known antibiotic with a broad activity spectrum and lysozyme which is an enzyme having also an antibacterial effect is discussed in this study. The synergistic action of these two agents is assessed on standard microbial strains such as *Staphylococcus aureus* and *Eperdimidis* and *Escherichia coli*. By spectroscopic analysis (FT-IR), it has been demonstrated that the coacervate forming the microcapsule was a polymeric complex formed between gelatin and alginate under appropriate conditions. In addition, kinetic studies showed that the active agents could diffuse across the polymeric membrane in simulated biological media with acceptable rates; this constitutes an important pledge in the possible application of microcapsules manufactured for pharmaceutical and/or para pharmaceutical applications.

Keywords : microencapsulation, Coacervation, microcapsules, Oxytetracycline, antibiotic, lysozyme, synergy, activity.



Liste des figures

Figure 1: Les modes d'action des antibiotiques chez les bactéries..... 6

Figure 2: Action antibactérienne de l'oxytétracycline..... 7

Figure 3: Répartition des protéines dans le blanc d'œuf..... 8

Figure 4: Un diagramme ruban de la structure tridimensionnelle du lysozyme. 9

Figure 5: Schéma représentant la morphologie des microparticules, d'après J.P. Benoît et J. Richard [12]..... 11

Figure 6: Images MEB de microcapsules (a) et de microsphères (b), d'après J.P. Benoît et J. Richard [12]..... 12

Figure 7: Représentation schématique d'un procédé de coacervation complexe appliqué à l'encapsulation de principes actifs, [17]..... 16

Figure 8: Microréacteurs et systèmes à libération déclenchée et prolongée [12]. 19

Figure 9: Illustration schématique de stimuli potentiels qui peuvent influencer la libération à partir des microcapsules [26]. 21

Figure 10: Profils de libération obtenus à partir de différents types. 22

Figure 11: Illustration schématique pour la préparation des perles de gel alginate [31]. 26

Figure 12: Caractéristiques spectrales UV-Vis de l'OTC et du Blanc d'œuf. 31

Figure 13: Courbe d'étalonnage dans l'UV-Vis de l'oxytétracycline dans l'eau distillée..... 32

Figure 14: Spectres FT-IR de l'oxytétracycline et du blanc d'œuf..... 33

Figure 15: Surnageant de lysozyme après séparation et centrifugation..... 35

Figure 16: Spectre FTIR du lysozyme extrait du blanc d'œuf de poule. 36

Figure 17: Coloration dans le dosage des protéines par la méthode de Bradford..... 36

Figure 18: Micrographies par MEB des microcapsules obtenues par coacervation. 39

Figure 19: Photos des billes d'alginate : en (A), vides; en (B) chargées de lysozyme..... 40

Figure 20: Photo des billes d'alginate sèches chargées de lysozyme et 1% de microcapsules chargées d'OTC..... 40

Figure 21: Micrographies par MEB des billes d'alginate contenant les microcapsules d'oxytétracycline : (A) forme sphérique ; (B) une découpe..... 41

Figure 22: Spectres FT-IR obtenus des différents composés constituant les microcapsules élaborées selon la méthode de coacervation complexe. 43

Figure 23: Émersion des disques dans l'antibiotique puis les déposés délicatement sur la suspension 44



Listes des figures et des tableaux

Figure 24: Zones d'inhibition pour l'oxytétracycline et le blanc d'œuf après incubation 24h à 37°C.....	45
Figure 25: Schémas Représentatif de la méthode des puits.	47
Figure 26: Profile de libération de l'oxytétracycline et de lysozyme dans le SIF, à 37°C.	49
Figure 27: Profile de libération de l'oxytétracycline dans le SGF, à 37°C.....	49
Figure 28: Solubilité de l'OTC en fonction du pH, d'après Mitscher [38].....	50
Figure 29: Profiles de libération de l'oxytétracycline et du lysozyme dans le SGF, à 37°C. .	50
Figure 31: Photographies montrant l'onguent préparé (a), sans capsules, (b), avec des capsules (5% en poids).	52
Figure 32: Courbe d'Etalonnage [protéine]=f(Absorbance).	55
Figure 33 : diffractogramme RX de l'oxytétracycline.	57
Figure 34 : diffractogramme RX des smart microcapsules chargé oxytétracycline.....	58

Liste des tableaux

Tableau 1: Principeaux matérieaux enrobant utilisés dans les différents procédés de la microencapsulation :	12
Tableau 2: Quelques applications industrielles de la microencapsulation [18-19-20-21].....	17
Tableau 3: Principaux objectifs de la microencapsulation.	18
Tableau 4: Caractéristiques de base de l'oxytétracycline et du blanc d'œuf.....	30
Tableau 5: Préparation des dilutions de la solution mère (Volume total = 2ml).	37
Tableau 6 : Préparation des échantillons à doser (Volume Totale=3,1ml).....	37
Tableau 7: Préparation des échantillons du Surnageant de lysozyme.	38
Tableau 8: Absorbance et concentration protéique d'échantillon de lysozyme.	38
Tableau 9 : Diamètre d'inhibition mesuré avec des souches testées par le lysozyme et l'oxytétracycline.....	45
Tableau 10: Diamètre d'inhibition des souches testées par le lysozyme.....	47
Tableau 11: Diamètre d'inhibition des souches testées par les billes d'alginate.	47
Tableau 12: Tableau montrant les diamètres d'inhibition mesurés selon la méthode des disques avec différentes souches microbiennes sur l'onguent variablement chargé.....	52



OTC: Oxytétracycline.

BO: Blanc d'œuf.

pH : le potentiel hydrogène.

RMN : résonance magnétique nucléaire.

O/W: oil/water.

E/H: eau / huile.

P.A : principe actif.

U.V-Visible : ultraviolet-visible.

DRX : Diffraction des Rayons X.

MEB : Microscopie Electronique à Balayage.

IRTF : Spectroscopie Infrarouge à Transformer de Fourier.

KBr : Bromure de potassium.

BSA : sérum bovin albumine.

P/P : poids/poids.

SGF : milieu simulé gastrique.

SIF : milieu simulé intestinale.

Tr/min : tour par minute.

QSP : quantité suffisante pour.

nm : nanomètre.

µl : microlitre

Gélose MH : gélose Mueller-Hinton.

P_{Ka} : le constant d'acidité (-log 10 K_a)

ATPS : aqueous two-phase system (système aqueux à deux phases).



INTRODUCTION GENERALE

Les médicaments sont administrés dans l'organisme le plus souvent par les voies orale, intramusculaire ou intraveineuse, et ceci en fonction de leurs propriétés intrinsèques liées à leur structure moléculaire et leur effet thérapeutique. Cependant, dans tous les cas, la quantité finale de médicaments atteignant un site d'intérêt correspond généralement à une très faible proportion de la dose administrée initialement. En outre, l'accumulation de ces substances dans des tissus qui ne sont pas impliqués dans la maladie, peut provoquer des réactions et conduire à des effets secondaires indésirables [1].

L'adressage de molécules thérapeutiques vers l'organe, le tissu ou la cellule malade constitue aujourd'hui un défi majeur pour le traitement efficace et ciblé des maladies humaines, notamment infectieuses, cancéreuses ou d'origine génétique. Dès le début du vingtième siècle, le savant Paul Ehrlich rêvait déjà du « magic-bullet » susceptible d'acheminer un médicament de manière spécifique vers son site d'action. Ce rêve est aujourd'hui proche de la réalité grâce au développement des nanotechnologies qui ont permis de proposer le concept de vectorisation des médicaments [2].

La vectorisation des médicaments est une méthode qui consiste à associer des principes actifs à un système de transport pour les transporter à travers l'organisme jusqu'au site à traiter. Dans ce cas, les principes actifs sont encapsulés et protégés par un vecteur, puis délivrés de façon contrôlée de différentes manières, ce qui conduit à une augmentation de leur efficacité après administration. Les concentrations et fréquences de délivrance peuvent être, ainsi, diminuées permettant ainsi une meilleure tolérance vis-à-vis du traitement [1].

Pour être efficace, le vecteur idéal doit présenter certaines caractéristiques :

- Sa composition doit faire intervenir des composés relativement stables en milieu physiologique, non toxiques pour l'organisme, biocompatibles et biodégradables, de manière à faciliter leur élimination ultérieure.
- Sa taille doit permettre à la fois le transport d'une quantité suffisante de principe actif et sa diffusion à travers certaines barrières physiologiques (barrière de l'endothélium, barrière hémato-encéphalique, organe, tissu, cellule, noyau cellulaire, etc.) pour atteindre la cible.
- Il doit garder le principe encapsulé de façon stable et active, posséder une grande spécificité vis-à-vis des cellules ciblées et rester le plus longtemps possible dans la circulation sanguine pour pouvoir atteindre sa cible.

- Le vecteur doit être suffisamment stable face à toutes les dégradations et interactions avec les biomolécules pendant son transport (notamment les protéines plasmatiques dans le cas d'une administration intraveineuse) et éviter les interactions en dehors de la zone visée.
- Une fois arrivé au niveau de la zone à traiter, il doit délivrer le médicament à proximité ou à l'intérieur des cellules ciblées. Ce processus de libération contrôlée est envisageable grâce aux propriétés de composés associés au vecteur (rupture enzymatique, liaison réversible, sensibilité à une variation du milieu comme le pH, la température, la force ionique, l'état d'oxydo-réduction).
- Enfin, il doit résister à la stérilisation et être aisément stocké et administré [1].

Dans ce travail, il est envisagé de préparer et de caractériser des microcapsules comportant deux principes actifs ; l'oxytétracycline (OTC) qui est un antibiotique possédant une activité antibactérienne très large et donc destiné à traiter de nombreuses maladies infectieuses et le Lysozyme qui est un enzyme trouvé dans les sécrétions (larmes) des glandes lacrymales d'animaux et dans le mucus nasal, les sécrétions gastriques et le blanc d'œuf. Le lysozyme catalyse la dégradation de certains glucides présents dans les parois cellulaires de certaines bactéries, par exemple les *cocci*. L'objectif principal visé ici consiste à étudier la synergie éventuelle de ces deux agents actifs à l'état encapsulé selon une procédure physico-chimique devant être sélectionnée et optimisée.

Ce mémoire comporte les deux chapitres suivants :

- **Un premier chapitre d'étude bibliographique** : donne un aperçu sur les antibiotiques, la molécule d'oxytétracycline et le lysozyme en tant qu'agents actifs et les notions de bases sur la vectorisation d'un principe actif en se basant sur la méthode de la micro encapsulation ainsi que le concept de libération des médicaments dans l'organisme.
- **Un deuxième chapitre de la partie expérimentale** : consistant en premier lieu à présenter les méthodes appliquées ainsi que le matériel utilisé, et ensuite l'analyse et les discussions sur les résultats obtenus.
- **Une conclusion générale** sur cette étude est donnée à la fin de cette étude.

I.1 Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances d'origine naturelle (élaborées par des champignons), ou des molécules obtenues par synthèse qui ont le pouvoir de s'opposer à la multiplication des germes microbiens. Leur action s'exerce de deux façons [3] :

- en inhibant leur multiplication : c'est l'action bactériostatique.
- en les détruisant : c'est l'action bactéricide.

I.2 La molécule d'oxytétracycline

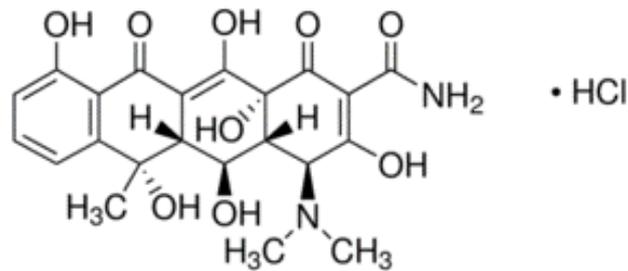
L'oxytétracycline est un antibactérien naturel de la famille des tétracyclines (qui doivent leur nom à leur structure tétra cyclique : noyau naphtacéne-carboxamide), isolé en 1948 par Finlay à partir d'échantillons de terre (d'où l'une de ses dénominations commerciales, la Terramycine r). Produite par un champignon de l'ordre des Actinomycètes (*Streptomyces rimosus*), elle possède une activité bactériostatique à large spectre sur les bactéries à Gram positif et négatif [4]. La 1ère tétracycline fut l'Auréomycine, élaborée par des champignons Actinomycètes : *Streptomyces auréofaciens* et doit son nom au fait qu'à un certain stade de son développement, le champignon donne naissance à un pigment jaune d'or.

On peut distinguer les tétracyclines :

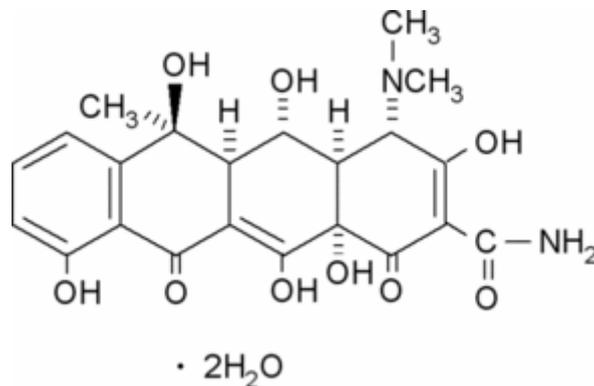
- de première génération, obtenues par des procédés fermentaires : chlorotétracycline, oxytétracycline, tétracycline, déméclocycline ;
- de deuxième génération, obtenues par hémi synthèse à partir des premières : doxycycline, minocycline.

L'oxytétracycline ou le (4S,4aR,5S,5aR,6S,12aS) - 4 - diméthyle - amino -1,4,4a,5,5a,6,11,12a octanhydro - 3,5,6,10,12,12 a-hexahydroxy-6-méthyl -1,11- dioxonaphtacéne -2- carboxamide, est commercialisée sous 2 formes :

- le chlorhydrate, de formule : $C_{22}H_{24}N_2O_9$, HCl et dont la structure est la suivante :



- le di hydraté, de formule : $C_{22}H_{24}N_2O_9$, H_2O dont la structure commune est :



L'oxytétracycline se fixe de manière réversible aux protéines plasmatiques, il peut donc être largement diffusé dans les différents organismes vivants. On relève les plus fortes concentrations dans les reins, le foie, la rate et les poumons (d'où l'importance du respect des délais d'attente). Elle fixe les ions métalliques et peut être de ce fait inactivé dans l'organisme d'où l'idée d'ajouter aux diverses formes des complexant. L'oxytétracycline diffuse facilement dans le liquide céphalorachidien, elle franchit la barrière placentaire et entre dans la circulation fœtale. L'élimination se fait sous une forme inaltérée, plus de la moitié par voie urinaire [3].

I.2.1 Caractéristiques et propriétés physico-chimiques

L'oxytétracycline est une poudre cristalline jaune de masse molaire 460,4 g/mol et de point de fusion 182 °C. Sous sa forme non ionisée, elle est peu soluble dans l'eau. Sous sa forme ionisée, elle est soluble dans l'eau et les alcools mais insoluble dans les solvants organiques.

La présence de plusieurs carbones asymétriques confère à l'oxytétracycline une action sur la lumière polarisée. Le pouvoir rotatoire spécifique de l'oxytétracycline est de -196 °C dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 0,1 mol/L. La présence de plusieurs systèmes de doubles liaisons conjuguées explique l'absorption de cette molécule à des longueurs d'onde situées dans l'ultraviolet et le visible, avec un maximum, dans la soude 0,1 mol/L, aux alentours de 355 nm [4].

La présence d'un groupement diméthylamine en position 4 est à l'origine du caractère basique de l'oxytétracycline. Par contre, les fonctions cétones et alcools induisent une acidité faible. L'oxytétracycline possède donc trois pKa à 3,3 (fonction énolique, carboxamide et cétone du cycle A), 7,3 (enchaînement dicétophenolique) et 9,1 (groupement diméthylamine). En milieu aqueux ou polaire, l'oxytétracycline manifeste un caractère amphotère. Le point isoélectrique se situe à un pH de 5,0 [4].

I.2.2 Activité antibactérienne

I.2.2.1 Spectres d'activité

L'oxytétracycline possède un spectre d'activité étendu sur les bactéries à Gram positif et Gram négatif. Elle est également active sur les bactéries anaérobies, les mycoplasmes, les rickettsies, les *Chlamydiae* et les leptospires. Elle possède aussi une activité sur les amibes, les coccidies ainsi que sur *Histomonas*.

Cet antibiotique est utilisé contre les bactéries pathogènes à Gram négatif des genres *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Flexibacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Haemophilus*. Il est également actif contre quelques bactéries pathogènes a Gram positif des genres *Renibacterium*, *Streptococcus* et *Clostridium*. L'activité antibactérienne de l'oxytétracycline contre *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio anguillarum* et *Yersinia ruckeri* est, in vitro, deux à huit fois plus faible à 4 °C qu'à 15 °C [4].

I.2.2.2 Mode d'action

L'oxytétracycline a une action bactériostatique, le mode d'action principal réside dans l'inhibition de la synthèse protéique en empêchant la liaison de l'aminoacyl-ARNt à la sous- unité 30 S du ribosome bactérien. L'oxytétracycline a également pour action l'inhibition de nombreux systèmes enzymatiques microbiens par chélation des cations des métaux bivalents [4].

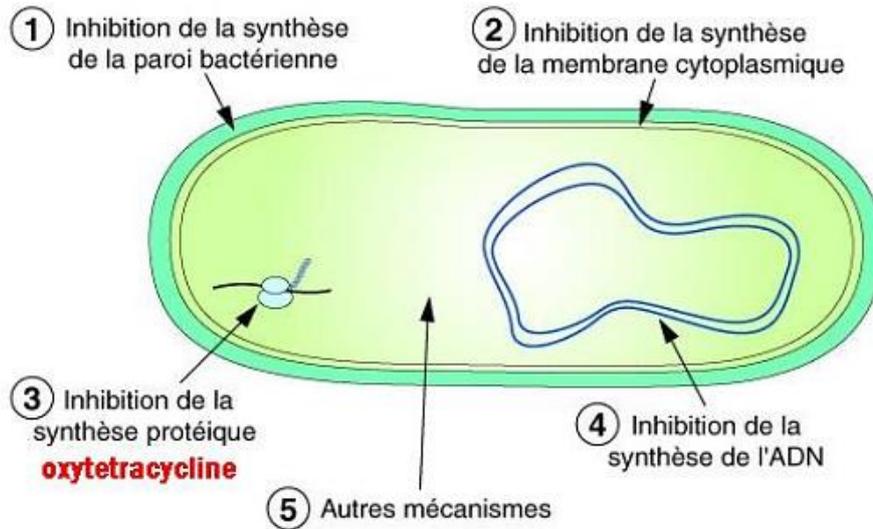


Figure 1: Les modes d'action des antibiotiques chez les bactéries.

L'oxytétracycline, sous la forme de complexes cationiques (probablement de calcium ou de magnésium), traverse passivement la membrane externe des bactéries à Gram négatif par les canaux porines Om pF et Om pC. Le complexe cation métallique-oxytétracycline est attiré à travers la membrane externe par le potentiel de Donnan. Il s'accumule ensuite dans le périplasme où il est probablement dissocié pour libérer de l'oxytétracycline non ionisée, molécule faiblement lipophile capable de diffuser à travers la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique. De la même façon, la forme non ionisée lipophile est probablement l'espèce transférée à travers la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif. Le passage des tétracyclines à travers la membrane cytoplasmique est actif et dépendant de la différence de pH entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Pour que l'oxytétracycline se chélate, il faut que le pH et la concentration en ions métalliques soient plus élevés à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cellule. En fait, il est probable que l'espèce active de l'antibactérien qui se fixe au ribosome soit le complexe métallique d'oxytétracycline. La liaison de l'oxytétracycline avec le ribosome est réversible, ce qui explique l'effet bactériostatique de cet antibiotique [4].

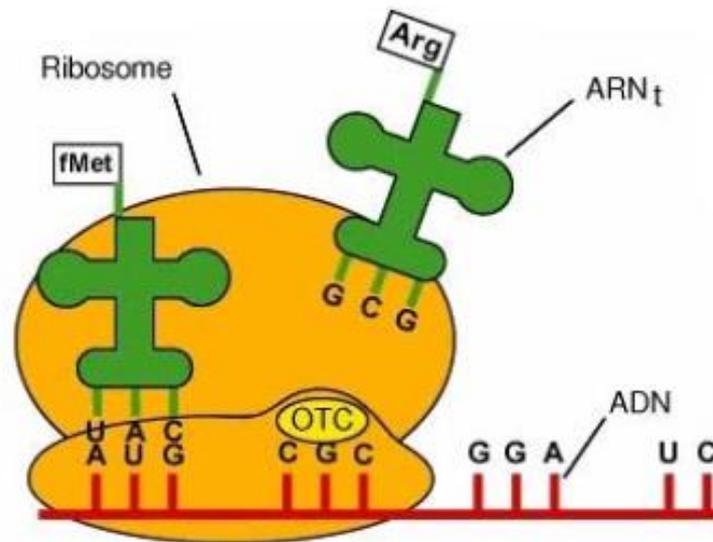


Figure 2: Action antibactérienne de l'oxytétracycline.

I.2.3 Indications de l'oxytétracycline

L'oxytétracycline est un antibiotique à activité anti-infectieuse très étendue avec une action sur un grand nombre de bactéries Gram positif et Gram négatif ainsi que sur les mycoplasmes et rickettsies. Ce très large spectre d'activité, associé à une excellente diffusion tissulaire, fait de l'oxytétracycline un anti-infectieux de choix dans de nombreuses infections rencontrées en médecine vétérinaire, notamment les affections microbiennes des appareils pulmonaire, digestif et génito-urinaire comme la pasteurellose, la péripneumonie bovine contagieuse, la brucellose et beaucoup d'autres encore. L'oxytétracycline injectable est également utilisé en prophylaxie, après un traitement local de plaies, tel que le mal de Garrot ou le piétin [5].

I.3 Composition chimique de blanc d'œuf

Le blanc d'œuf se compose principalement d'eau (88 %) et de protéines (11%), avec le reste composé de glucides, les cendres et les traces de lipides (1 %).

Ovalbumine (54 %), l'ovotransferrine (12 %), l'ovomucoïde (11 %), le lysozyme (3,5 %) et l'ovomucine (3,5 %) sont considérés comme étant les principales protéines et avidine (0.05%), cystatine (0.05%), ovomacroglobuline (0,5 %), ovoflavoprotéine (0,8 %), ovoglycoprotéine (1,0 %) et ovo inhibiteur (1,5 %) sont les protéines mineures trouvées dans le blanc d'œuf .Ces protéines sont reconnues pour leur importance fonctionnelle. Chaque protéine a de nombreuses fonctions fonctionnelles propriétés, et les protéines ont été séparées de blanc d'œuf selon diverses approches. [6]

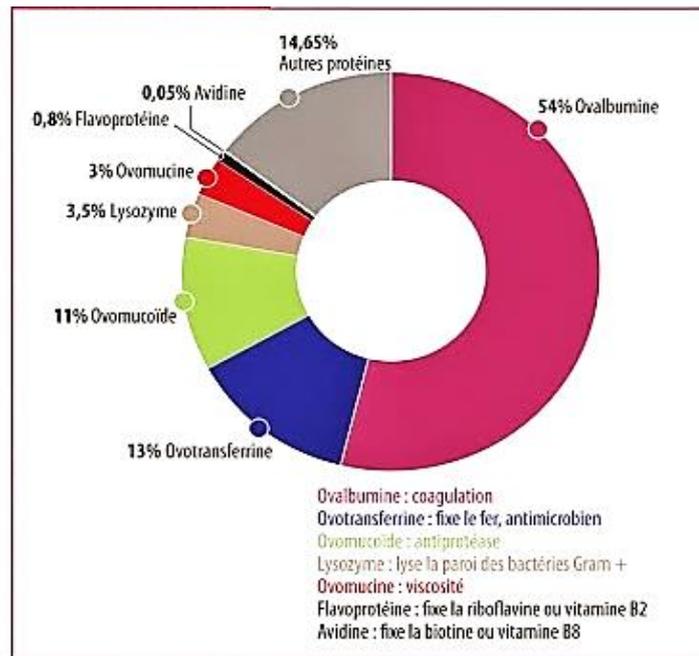


Figure 3: Répartition des protéines dans le blanc d'œuf.

I.3.1 Le Lysozyme

C'est une protéine importante trouvée dans le blanc d'œuf. Naturellement, il existe des nombreuses formes, mais le lysozyme trouvé dans l'œuf est le plus soluble et stable parmi d'autres.

C'est une enzyme omniprésente qui peut hydrolyser le lien β entre l'acide N-acétylneuraminique et la N-acétyl glucosamine de la paroi cellulaire dans la bactérie ; on l'appelle N-acétyl-muramic-hydrolase et se compose de lysine et de leucine dans le N- et C-terminal, respectivement. Le poids moléculaire du lysozyme est de 14400 Da et se compose d'une seule chaîne de polypeptides avec 129 acides aminés. Dans la nature, cette protéine se trouve comme monomère mais est occasionnellement présente comme un dimère avec plus de stabilité thermique. Le lysozyme à 4 ponts désulfurés menant à une grande stabilité thermique, et son point isoélectrique correspond à un pH égal 10.7. Il a une tendance à se lier aux protéines chargées négativement telles que l'ovomucine dans le blanc d'œuf [6].

I.3.1.1 Structure

Il existe plusieurs types de lysozyme, le plus courant et le plus étudié étant le lysozyme c (celui présent dans l'œuf de poule) [7]. Il présente 129 résidus d'acides aminés, un PM de 14,4 KDa et un pH isoélectrique très élevé de 10,7. Environ 40 % de ces résidus sont hydrophobes et un tiers représente des espèces chargées parmi lesquelles une proportion importante de résidus

basiques. Ceci confère à la protéine respectivement sa structure globulaire et un pHi particulièrement élevé de 10,7 [8]. Le lysozyme est la seule protéine connue du blanc d'œuf avec l'avidine à posséder un pHi basique. Il peut de ce fait former des complexes électrostatiques avec des protéines comme l'ovomucine, l'ovotransferrine ou l'ovalbumine. Le complexe ovomucine-lysozyme est ainsi connu pour jouer un rôle important dans l'évolution des propriétés viscoélastiques du blanc d'œuf au cours du vieillissement [9].

Le lysozyme possède quatre ponts disulfures entre les Cys 6 et 127, 30 et 115, 64 et 80, 76 et 94, qui pourront réagir avec les thiols libres de certaines protéines telle l'ovalbumine, par échange SH/SS. En ce qui concerne la structure secondaire, le lysozyme compte 8 hélices α pour un seul feuillet β . La structure tertiaire du lysozyme a été largement étudiée par RMN et rayons X (**figure 4**). La chaîne est repliée sur elle-même de manière à ce que les quarante acides aminés N-terminaux forment un domaine globulaire compact avec un corps hydrophobe enfermé entre 2 hélices α . Un second domaine plus hydrophile (40-85ième acides aminés) constitue une face de la cavité du site actif du lysozyme. Le reste de la chaîne remplit l'espace entre les deux domaines et lie la cavité du site actif aux résidus hydrophobes. Tous les résidus polaires chargés, à une ou deux exceptions près, sont exposés à la surface de la protéine, les groupements apolaires ou hydrophobes sont en grande majorité enfouis à l'intérieur, les flancs non polaires des hélices se tassent les uns contre les autres. Le feuillet β , plus exposé au solvant, est entièrement hydrophile [7] [9].

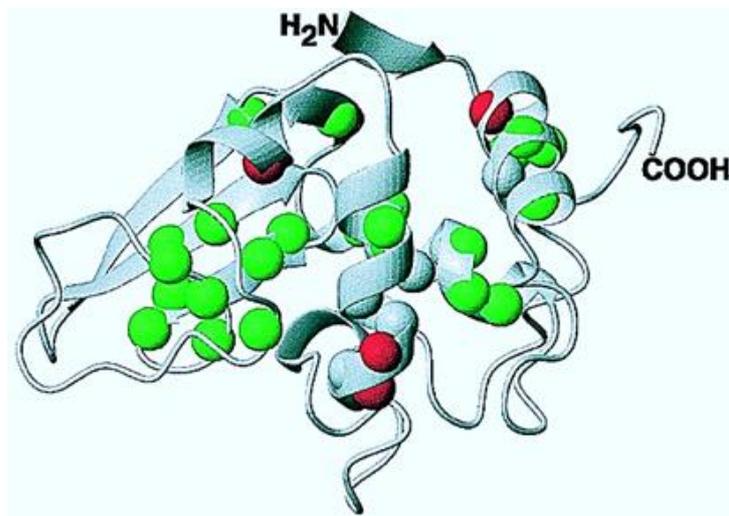


Figure 4: Un diagramme ruban de la structure tridimensionnelle du lysozyme.

I.3.1.2 Fonctions du lysozyme

Le Lysozyme est une enzyme (CE.3.2.1.17) connu aussi comme une muramidase et N-acetylmuramique hydrolase [8], une enzyme qui appartient à la classe des enzymes qui lyse les parois des cellules bactérienne Gram+ [7], de ce fait elle est potentiellement utilisée comme un agent antimicrobien dans les aliments et les médicaments [10].

Des chercheurs ont également constaté que le lysozyme de blanc d'œuf possédait une activité bactéricide autre que l'hydrolyse enzymatique des parois bactériennes. Cette activité contre les bactéries Gram+ et Gram- peut être obtenue par dénaturation partielle du lysozyme [9]. Ces propriétés bactéricides assurent à l'embryon une protection contre les invasions bactériennes et sont exploitées industriellement. Ainsi, le lysozyme a été largement utilisé dans la fabrication de fromages à pâte pressée cuite pour prévenir les défauts liés à une contamination par *Clostridium tyrobutyricum*, [7] et en raison de son inactivité vis-à-vis des souches de fermentation et des cultures secondaires nécessaires à l'affinage des fromages. Le lysozyme peut également limiter la croissance de bactéries pathogènes, par activité lytique, dans les aliments réfrigérés comme le *Listeria monocytogène*, le *Clostridium botulinum*, le *Clostridium jejuni* et *Yersinia enterocolitica* [11].

Il est également utilisé en tant que conservateur naturel, notamment au Japon, pour prolonger l'état de fraîcheur des légumes et des aliments à base de produits de la mer ou de produits carnés. Les propriétés du lysozyme sont également exploitées dans les thérapies contre des infections virales ou bactériennes notamment au niveau de la cavité buccale (Lysopaïne®). Le lysozyme est utilisé également comme analgésique et comme agent stimulant dans les traitements antibiotiques [9].

I.4 Microencapsulation

L'encapsulation est un ensemble de méthodes et de techniques visant l'inclusion d'un principe actif dans une matrice inactive ou inerte afin d'améliorer les propriétés de conservation, de présentation et de biodisponibilité [12].

I.4.1 Définition

La microencapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active. Les microparticules présentent une taille comprise entre 1 µm et 1 mm et contiennent typiquement entre 5 et 90 % (en masse) de matière active. Les matières actives candidates pour

cette application sont d'origines très variées : principes actifs pharmaceutiques, actifs cosmétiques, additifs alimentaires, produits phytosanitaires, essences parfumées, micro-organismes, cellules, ou encore catalyseurs de réaction chimique,...etc.

Les matériaux enrobant constituant un film ou une matrice sont en général des polymères d'origine naturelle ou synthétique, ou des complexes lipidiques, entre autres [12]. En outre, la substance encapsulée peut se présenter sous la forme de fines particules de solide divisé, d'un liquide, ou encore d'un composé gazeux [13].

I.4.2 Historique

La première application industrielle de microparticules date des années 1950 quand Green et Schleicher cité en référence [14] ont encapsulé des particules de pigments dans des polymères naturels constitués par la gélatine (protéine) et la gomme arabique (polysaccharide) selon la méthode de coacervation complexe. Cette stratégie, utilisée pour la production de papier "carbone", permet la duplication d'un texte ou d'une figure sous l'effet d'une faible pression en encapsulant des colorants [14].

I.4.3 Classification des microparticules

Il existe deux types de microparticules qui diffèrent par leur microstructure (**Figures 5 et 6**) [15] : la microcapsule, particule sphérique de type «cœur-membrane» dans laquelle le cœur est constitué de la substance active et la membrane de l'agent encapsulant qui forme l'enveloppe solide, et la microsphère, constituée d'un réseau polymère dans lequel la substance active est dispersée à l'état moléculaire ou particulaire (structure dite de type matriciel).

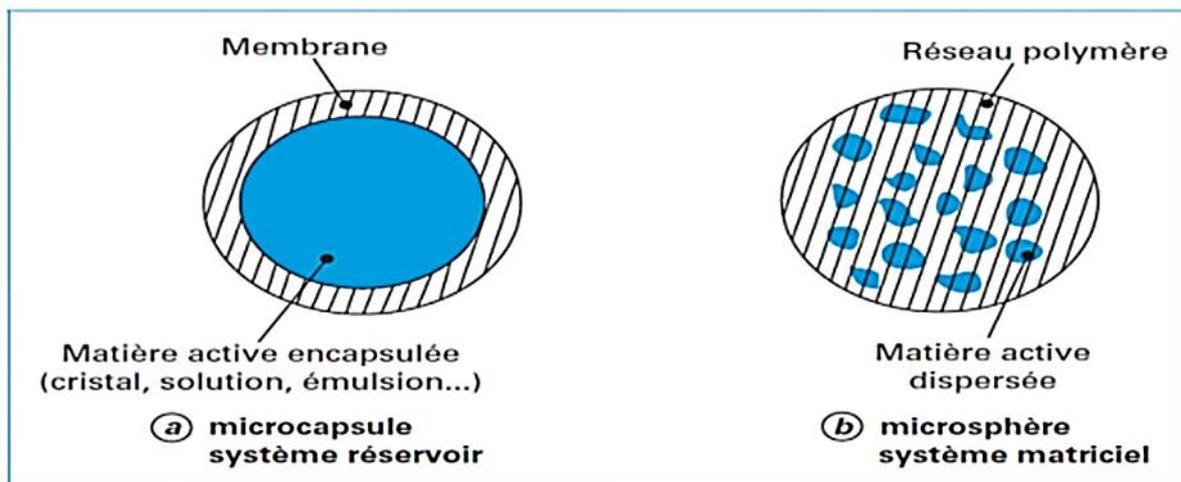


Figure 5: Schéma représentant la morphologie des microparticules, d'après J.P. Benoît et J. Richard [12].

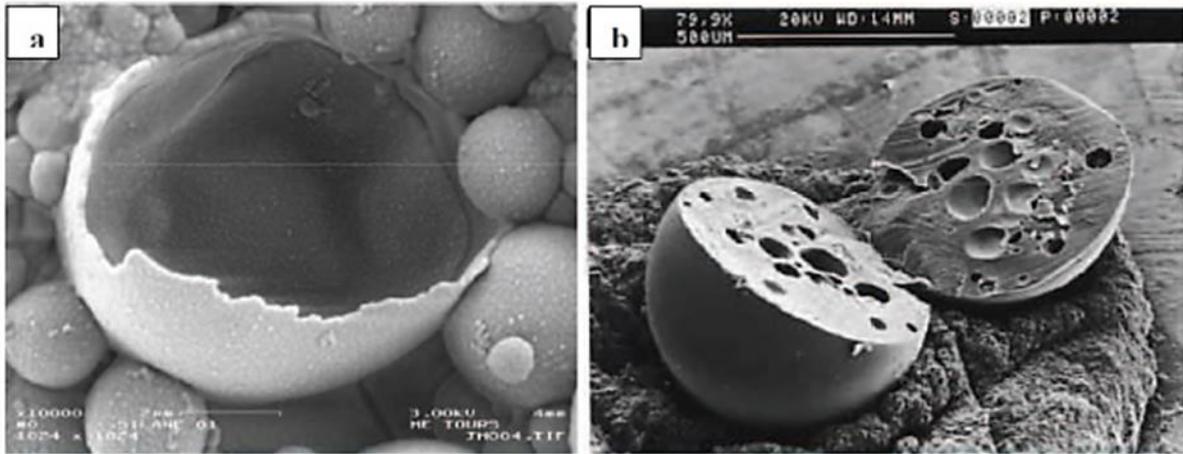


Figure 6: Images MEB de microcapsules (a) et de microsphères (b), d’après J.P. Benoît et J, Richard [12].

I.4.4 Composition habituelle des microparticules :

Les constituants principaux d’une particule obtenue par microencapsulation sont la matière enrobant et la matière active. Afin d’améliorer la stabilité du système et/ou lui apporter des fonctionnalités désirées, des additifs peuvent également être ajoutés.

* Les matériaux enrobant utilisés dans les procédés physico-chimiques et mécaniques sont cités dans le tableau 1 suivant [12] :

Tableau 1: Principaux matériaux enrobant utilisés dans les différents procédés de la microencapsulation :

Principaux matériaux enrobant	Procédés mis en œuvre	Exemples de domaines d’application
Polymères d’origine naturelle		
Alginate de sodium	Coacervation Complexe Prilling	Biomédicale : encapsulation des cellules Aromes Cosmétiques Parfums Phytopharmaceutique
Chitosane	Coacervation complexe Prilling Spray drying Spray coating	Pharmacie Administration orale Libération gastrique Masquage de goût
Amidon	Spray-drying	Alimentaire : encapsulation d’arômes, d’huiles essentielles ou aromatiques, de vitamines et d’épices
Polymères cellulosiques		
Ethyl cellulose (EC)	Coacervation simple	Pharmacie

Hydroxypropylcellulose (HPC)		
Hydroxy propyl méthyl cellulose (HPMC)	Spray coating Spray-drying	Masquage de gout Administration orale
Esters de cellulose entérosolubles	Evaporation-extraction de solvant	Libération prolongée ou déclenchée (entérique)
Phtalate d'Hydroxy propyl méthyl cellulose		
Polymères synthétiques		
Copolymères acryliques et méthacryliques	Spray-drying Spray-coating Extraction-Evaporation de solvant	Pharmacie : Administration orale Libération gastrique Libération entérique Libération prolongée Masquage de goût
Polyoléfines	Co-extrusion – Sphéronisation Évaporation de solvant	Chimie Biomédical Phytosanitaire Libération prolongée ou déclenchée par élévation de température
Copolymères vinyliques		
Homopolymères et copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique (PLA, PLGA)	Coacervation simple Spray-drying Evaporation – Extraction de solvant Évaporation – Extraction de solvant	Pharmacie : Libération prolongée Administration parentérale de peptides
Lipides solides		
Corps gras solides (esters, alcools, acides gras)	Procédé par rupture de jet (prilling) Solidification d'émulsion (hot melt) Spray-coating Procédé de coacervation en milieu Supercritique	Cosmétique Chimie Pharmacie Libération prolongée ou déclenché par élévation de température Stabilisation de matières actives Masquage de goût
Glycérides		
Cires (d'abeilles, de Carnauba, de Candelilla...)		

La matière active est la partie qui détermine l'utilisation suivante des microparticules produites. La nature des substances actives utilisées dans la microencapsulation est très variable ; Parmi les ingrédients que l'on peut protéger et isoler se trouvent :

- Des arômes, des huiles essentielles et des substances odorantes volatiles. ;
- Des vitamines, comme l'acide ascorbique (vitamine C), le β -carotène (vitamine A) le tocophérol (vitamine E), ...etc.

- Des lipides sensibles à l'oxydation tels que des acides gras polyinsaturés ;
- Des acides et bases alimentaires (acide citrique, bicarbonate de sodium) ;
- Des additifs alimentaires (colorants, conservateurs) ;
- Des bactéries et des enzymes ;
- Des principes actifs pour l'industrie pharmaceutique ;
- Des principes actifs cosmétiques ;
- Des minéraux (sels du calcium ou du fer) [16].

En plus du matériau enrobant et la matière active, certains additifs peuvent également être ajoutés dans le système avant la microencapsulation. Parmi les additifs les plus souvent utilisés on trouve les agents tensioactifs, les agents antimicrobiens ou encore les agents réticulant. Dans le cas de l'utilisation d'un principe actif hydrophobe, la stabilisation de l'émulsion, avant l'étape de microencapsulation, peut se faire en présence d'un agent tensioactif. Les surfactants utilisés pour stabiliser la phase huileuse de l'émulsion sont les oléates de sorbitane (Span), les polysorbates (Tween) ou le polyricinoléate de poly glycérol et les copolymères à blocs (Synperonic). Ces tensioactifs sont ajoutés dans les préparations liquides en faible quantité (de 0,5 % à 5 %) [17].

I.4.5 Méthodes d'encapsulation

Il existe actuellement plusieurs méthodes conduisant à l'obtention de microcapsules. Nous citons ci-dessous les plus importantes d'entre elles.

I.4.5.1 Procédés chimiques

Les procédés chimiques sont basés sur la formation in situ du matériau enrobant par polycondensation, polymérisation radicalaire, ou polymérisation (polyaddition) anionique d'unités monomères. Ils se démarquent ainsi des deux classes de procédés décrites précédemment, qui font appel à des agents enrobant préformés, tels que des polymères ou des lipides [12].

I.4.5.2 Procédés physico-mécaniques

Les procédés mécaniques mettent en œuvre des techniques de pulvérisation (spray-drying, spray coating) pour la formation de gouttes ou gouttelettes (prilling) et d'extrusion (extrusion /Sphéronisation) [12].

I.4.5.3 Procédés physico-chimiques

Les procédés physico-chimiques sont basés sur la maîtrise de certaines propriétés :

- de variations de solubilité et de conditions de précipitation des agents enrobant. Il s'agit, par exemple, de la précipitation contrôlée d'un polymère en solution, par ajout d'un non-solvant ou d'un polymère incompatible (coacervation simple), ou encore par variation de température et de pH de la solution (coacervation complexe) ;
- de changements d'état (fusion et solidification) des agents enrobant (gélification thermique d'émulsions). Les membranes obtenues peuvent être renforcées par adsorptions successives de poly électrolytes de charges opposées [12].

I.4.6 Microencapsulation par coacervation complexe

Le processus de coacervation complexe est un système triphasé impliquant le solvant, le matériau actif et le matériau de revêtement. En général, ce processus comprend quatre étapes comme le montre la (**figure 7**).

- la préparation d'une solution aqueuse de deux polymères ou plus. La solution est généralement préparée au-dessus de la température gélifiant et au-dessus du point isoélectrique de la protéine ;
- le mélange de la phase hydrophobe à la solution aqueuse d'un polymère, généralement une solution protéique, et homogénéisation du mélange résultant
- changement du pH et de la température à un certain niveau requis pour induire la coacervation et la séparation de phase ;
- durcissement des matrices polymères par température élevée, désolvation ou réticulation.

La coacervation est amorcée soit en abaissant la température, soit en modifiant le pH, soit par dilution ou l'ajout d'un sel (connu sous le nom d'agent de coacervation). Il commence par la formation de coacervat très fine les particules donnant lieu à la turbidité dans la solution réactive, qui reste claire ou transparent. Cette étape de coacervation est généralement appelée micro-coacervation. [17].

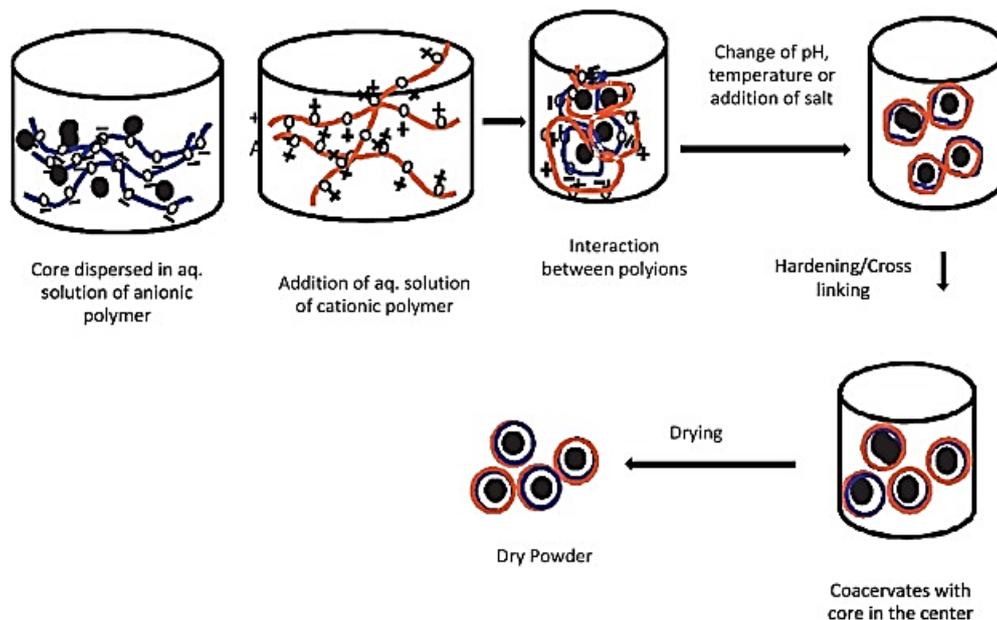


Figure 7: Représentation schématique d'un procédé de coacervation complexe appliqué à l'encapsulation de principes actifs, [17].

I.4.7 Microencapsulation par coacervation simple

La coacervation simple se rapporte aux procédés faisant intervenir la désolvation d'un seul polymère par l'un des facteurs suivants : abaissement de température, addition d'un non solvant, addition d'électrolytes, addition d'un deuxième polymère incompatible. Ce phénomène peut se dérouler en milieu aqueux ou organique. Les étapes du procédé sont en tous points identiques à celles décrites pour la coacervation complexe.

Les particules obtenues sont généralement des microcapsules. Toutefois, dans certains cas, le procédé par coacervation simple permet d'obtenir des microsphères. C'est le cas lorsque la proportion de substance active est faible par rapport au volume du coacervat. La taille des microparticules obtenues ainsi que la teneur en matière active sont semblables à celles résultant du procédé par coacervation complexe [12].

I.4.8 Application de la microencapsulation

La fabrication de capsules renfermant des colorants pour la préparation de papiers permettant la duplication sous faible pression, à la fin des années 1950, est la première application industrielle de la microencapsulation. Puis les recherches dans le domaine de l'encapsulation se sont intensifiées, afin de développer de nouvelles technologies d'encapsulation, des nouveaux composés, et de proposer de nouveaux matériaux enveloppants, comme par exemple des polymères biocompatibles pour le domaine médical [18].

On trouve désormais des applications de la microencapsulation dans de nombreux domaines industriels, listés dans le tableau 2 dans lequel sont également précisés des exemples de composés encapsulés [18-19-20-21].

Tableau 2: Quelques applications industrielles de la microencapsulation [18-19-20-21].

Domaine industriel	Exemples de composés encapsulés
Pharmacie et médical	Antibiotiques, contraceptifs, enzymes, vaccins, bactéries, vitamines, minéraux, antigènes, anticorps
Cosmétique	Parfums, huiles essentielles, anti transpirants, agents bronzants, crèmes solaires, colorants capillaires, baumes démêlants, mousses à raser
Alimentaire	Huiles essentielles, graisses, épices, arômes, vitamines, minéraux, colorants, enzymes, levures, microorganismes
Agriculture	Herbicides, insecticides, engrais, répulsifs, hormones végétales
Biotechnologie	Enzymes immobilisées, microorganismes, cellules vivantes, cellules artificielles, cultures tissulaires, composés nutritionnels
Chimie	Catalyseurs, enzymes, additifs pour plastiques, eau (plâtre et béton), inhibiteurs de corrosion, retardateurs d'incendie, colorants et pigments, agents UV protecteurs, parfums, huiles essentielles, agents lubrifiants...
Détergent	Adoucissants, antistatiques, agents décolorants, agents moussants, silicones, cires, détachants...
Textile	Colorants, parfums, pigments, bactéricides, fongicides, répulsifs d'insectes, agents antistatiques, retardateurs d'incendie, agents imperméabilisants, adhésifs, composés bioactifs médicaux, composés bioactifs cosmétiques
Photographie	Halogénures d'argent, pigments, colorants, composés photo polymérisables, révélateurs pour photographies couleurs, plastifiants...
Graphisme et impression	Colorants, pigments, parfums, révélateurs, cristaux liquides, toners, composés photosensibles...
Electronique	Cristaux liquides, matériaux semi-conducteurs, adhésifs, agents de séchage, retardateurs de flammes, antistatiques...

Traitement des déchets	Microorganismes, substrats, détoxifiants, déchets liquides (solidification), déchets industriels à risques, déchets radioactifs...
-------------------------------	--

I.4.9 Objectifs de la microencapsulation

Étant donné que l'encapsulation est coûteuse, l'exigence doit d'abord être justifiée. Nous pouvons classer cinq catégories pour les objectifs de l'encapsulation, le tableau suivant présente quelque exemple de motivation d'utilisation de l'encapsulation [22].

Tableau 3: Principaux objectifs de la microencapsulation.

Type d'encapsulation	PA	Motivation spécifique
Immobilisation	-Cellules, enzymes -Substance volatiles	-Procédé continu ou accélération du procédé -Allongement de leur durée de vie
Protection	-Cellule, enzymes -Vitamines, huiles insaturées -Aliments, environnement	-Protection contre le lessivage, le cisaillement -Protection contre l'oxygène, la lumière, la chaleur -Elimination du gout, des acides, des enzymes
Relargage	-Matière active ou un de ses sous-produits formés en présence d'un des matériaux encapsulant	-Libération au moyen de la température, d'une force -Libération au cours du temps, -Libération dans certains environnements (acide, basique, hydratés...)
Fonctionnalisations	-Liquides/ gaz -Solides/liquides/gaz -Enzyme et un des matériaux encapsulant	-Les formuler sous formes solide -Les disperser dans des formulations liquides ou sèches -Formulation d'un biocapteur

I.4.10 Libération contrôlée d'un principe actif

Par définition, le rôle d'un système à libération contrôlée est de délivrer la bonne quantité d'un PA, au bon endroit et au bon moment. Lorsqu'on considère les interactions matière active/milieu extérieur, les microparticules peuvent être classées en deux catégories : celles qui ne doivent pas libérer leur contenu telles que les microréacteurs contenant des enzymes ou des

bactéries, et celles qui sont formulées de façon à libérer la matière active encapsulée. Dans ce dernier cas, il faut distinguer (**figure 8**)

- les systèmes à libération déclenchée,
- les systèmes à libération prolongée. [12].

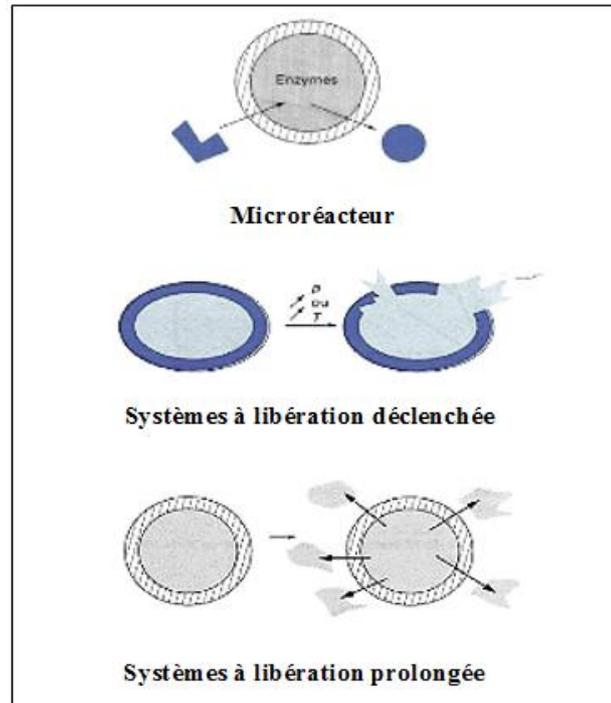


Figure 8: Microréacteurs et systèmes à libération déclenchée et prolongée [12].

I.4.10.1 Mécanismes de la libération contrôlée

Les systèmes à libération contrôlée possèdent des exigences particulières au (x) matériau (x) impliqué (s), qui sont de nature polymérique sous forme de matériau plein ou d'une membrane [23].

- Systèmes à libération déclenchée :** sont généralement des microcapsules formées d'une membrane de faible perméabilité, qui vont libérer brutalement leur contenu. Les mécanismes de la libération connus dans ce cas sont :
 - Mécanismes de libération par éclatement sous l'effet d'une pression (mécanique ou osmotique) ;
 - Mécanismes de libération par fusion sous l'effet de la température [23].
- Systèmes à libération prolongée :** concernent majoritairement des microsphères [23]. Les mécanismes mis en jeu sont :

- Mécanismes de libération par dégradation :

La plupart des polymères biodégradables se dégradent par hydrolyse en composés de taille de plus en plus faibles, biologiquement éliminables, dans certains métabolique. La dégradation peut s'effectuer selon une hydrolyse en masse, il est uniforme dans toute la matrice polymère ou bien se produire uniquement sur la surface du polymère.

- Mécanisme de libération par diffusion uniquement :

La diffusion se produit quand un principe actif traverse le polymère qui forme le système de libération. La diffusion peut se produire à l'échelle macroscopique à travers les pores dans la matrice ou à l'échelle moléculaire par le passage entre les chaînes de polymères (lois de FICK).

- Mécanismes de libération par gonflement suivi d'une diffusion :

La compréhension des mécanismes de gonflement des polymères dans l'organisme est importante pour permettre de concevoir le système particulier de libération contrôlée et permet d'expliquer les comportements cinétiques libération. Le PA est dissout ou dispersé au sein d'une matrice polymérique à partir de laquelle il est capable d'en sortir.

En premier lieu, le polymère ne subit aucune modification chimique, il n'est pas dégradé, l'eau diffuse simplement à l'intérieur du réseau polymère, le gonfle, ce qui permet ensuite aux molécules actives piégées à l'intérieur de se libérer.

Les systèmes de libération contrôlée par gonflement sont initialement secs et quand ils sont placés dans le corps, ils absorberont l'eau ou autres fluides du corps et gonfleront. Ces systèmes permettant la diffusion du PA à travers le réseau gonflé dans l'environnement externe. La plus part des matières utilisées dans ces système sont les hydrogels (absorbant de l'eau ou autres fluides sans être dissout).

La capacité de gonflement du polymère se manifeste quand le gonflement peut être déclenché par un changement de l'environnement entourant le système de la libération. Dépendant du polymère, le changement environnement peut impliquer le pH, la température, ou la force ionique, et le système peut se rétrécir ou gonfler sur un changement de n'importe lequel de ces facteurs environnementaux [24].

I.4.10.2 Paramètres influençant la libération d'un PA

Il est important de noter que les paramètres influençant la libération d'un PA encapsulé sont nombreux :

- Solubilité du PA dans le milieu de libération et dans la paroi polymérique ;
- Taux d'encapsulation ;
- Interactions chimiques entre le PA et le polymère ;
- Caractéristiques morphologique de système de libération (porosité, tortuosité, surface, forme) ;
- Caractéristiques de polymère tel que poids moléculaire (des études récentes montrent que les polymères de faibles poids moléculaires présentent une porosité plus élevée que d'autre, donc une libération plus élevée [25]).

Les microcapsules dites « intelligentes » peuvent donc réagir à ces stimuli extérieurs et subir des modifications relativement importantes de leur structure et de leurs propriétés telles que la perméabilité ou encore la résistance mécanique. [26].

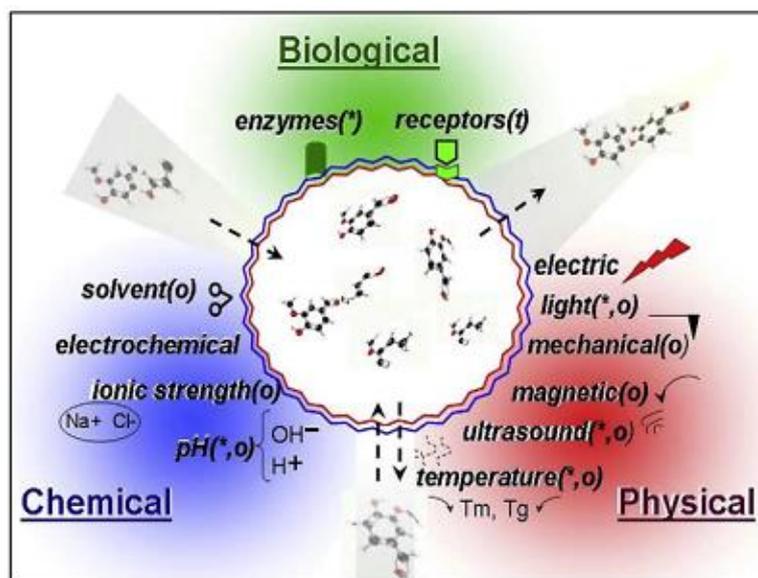


Figure 9: Illustration schématique de stimuli potentiels qui peuvent influencer la libération à partir des microcapsules [26].

Les microcapsules intelligentes présentent un large spectre d'applications surtout dans le domaine médical pour des applications de libération contrôlée. L'objectif est de développer des microcapsules intelligentes qui protègent leur contenu contre les influences extérieures et le libèrent uniquement en réponse à certaines conditions environnementales (stimuli).

Ces stimuli peuvent être chimiques (pH, force ionique,...), physiques (température, laser, champs magnétiques, stress mécanique, ultrasons,...) ou biologiques (enzyme, récepteurs) (**figure 9**) [26].

I.4.10.3 Profil de libération

La diffusion du PA selon les modes de la cinétique de libération obéit aux trajets de la (**figure 10**). À partir des microcapsules, on peut obtenir des cinétiques de libération d'ordre 0 ou d'ordre 1 (profils A et D), en fonction de la solubilité dans l'eau de la matière active.

Les cinétiques d'ordre 0 peuvent être modifiées dans leur phase initiale : Soit la vitesse de libération est exagérément marquée (effet de BURST) en raison de la présence d'un excès de matière active dans la membrane (profil B), soit un temps de latence qui précède la libération, temps nécessaire par exemple pour que le principe actif diffuse à travers la membrane, avant d'atteindre le milieu extérieur (profil C).

À partir de microsphères, la cinétique obéissant à la loi d'HIGUCHI (profil E) [12].

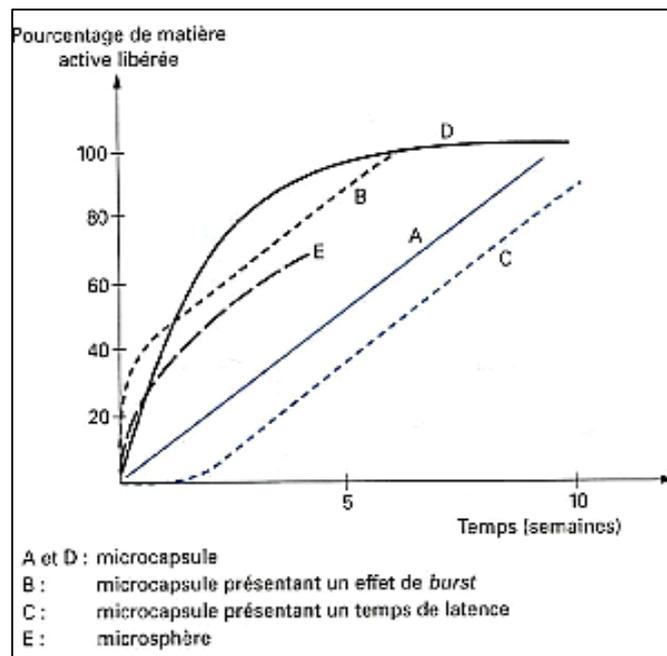


Figure 10: Profils de libération obtenus à partir de différents types.

Les microparticules à libération prolongée sont très largement utilisées dans les domaines agroalimentaire et pharmaceutique [12].

II.1 Matériels et méthodes

II.1.1 Introduction

Afin de concevoir un protocole expérimental cohérent et le plus complet possible, nous avons fait appel dans cette étude à plusieurs méthodes et techniques instrumentales permettant de caractériser les matières utilisées, notamment les principes actifs (oxytétracycline et lysozyme du blanc d'œuf) ou les systèmes combinés tels que les capsules. Ce protocole comprend surtout les tests liés à la nature, l'identification et le dosage des différents composés utilisés.

II.1.2 Testes organoleptiques habituels

II.1.2.1 Aspects

L'aspect des principes actifs a été vérifié à l'œil nu.

II.1.2.2 pH

Le pH des solutions pour chaque principe actif a été mesuré à l'aide d'un pH mètre.

II.1.2.3 Solubilité

La solubilité des différents composés utilisés a été testée dans différents solvants.

II.1.3 Caractérisation spectroscopique

Les méthodes spectroscopiques usuelles -FTIR et UV-Vis- ont été utilisées dans ce travail pour les besoins d'identification ou de dosage. Un spectroscope FTIR de type JASCO 4100 a été utilisé pour l'analyse dans l'infrarouge. Une masse de 2 mg d'oxytétracycline (ou quelques microgouttes dans le cas de l'échantillon liquide) est dispersée dans environ 300 mg de bromure de potassium (KBr) ; le mélange de KBr /OTC obtenu est ensuite broyé et pressé pour former des pastilles. Les spectres sont enregistrés dans le domaine 400-4000 cm^{-1} .

L'analyse dans le domaine spectroscopique de l'UV-Vis a été accomplie à l'aide d'un instrument de type SHIMADZU UV-1800 permettant l'investigation de 190 à 900 nm. Des solutions de titres connus sont utilisées dans ce cas : 0.25mg/ml pour l'oxytétracycline et dans le cas du blanc d'œuf :

- filtrer de blanc d'œuf sur gaze et récupérer le filtrat.
- mélanger 1 volume du filtrat avec 2 volumes d'eau distillée avec agitation magnétique.

II.1.3 Dosages

La détermination quantitative des produits actifs dans différentes formes est effectuée par spectrophotométrie dans l'UV-Vis en établissant en préalable des courbes d'étalonnage (droites) à des longueurs d'onde spécifiques. En effet, à partir de la solution mère préparée de concentration connue, nous avons procédé à des dilutions appropriées afin de déterminer la gamme d'étalonnage et de vérifier ainsi la linéarité de la relation absorbance en fonction de la concentration. La mesure a été effectuée à $\lambda = 354 \text{ nm}$ dans le cas de l'oxytétraciline.

II.1.4 Extraction du lysozyme à partir de l'œuf de poule

Du fait de notre intérêt porté dans ce travail à l'utilisation de la lysozyme en tant qu'actif antibactérien plutôt que du blanc d'œuf qui est de toute évidence un mélange de protéine, nous nous orientés par la suite à la tentative de l'extraction, la séparation et la purification de cet enzyme selon la procédure suivante :

- **Selon la méthode à deux phases**

Pour l'extraction du lysozyme, le polyéthylène glycol PEG (16.1% p/p) a été dissout dans une quantité suffisante d'eau désionisée, après la dissolution total du polymère on a ajouté les sulfates de sodium Na_2SO_4 (à 12% P/P), également on a versé 500 mM de perchlorate de sodium dans le mélange obtenu. Pour 20 ml du mélange obtenu on ainsi ajouté 20 ml du blanc d'œuf pure. Et pour ajuster le pH du système obtenu à 10 on a utilisé une solution de NaOH et/ou HCl. Les phases ont été dispersées progressivement pendant 30 min à 25°C (température ambiante). En vue de l'obtention du produit cherché on a effectué une séparation par centrifugation à basse vitesse à 1500 tr/min pendant 20 min, à la fin on a obtenu deux phases d'où on trouve le lysozyme dans la phase supérieure. Par la suite on a récupéré cette dernière à l'aide d'une seringue. Et finalement on a effectué une dilution pour les tests d'activité microbiologique [28].

II.1.4.1 Dosage des protéines selon la méthode de Bradford

La méthode de Bradford est une méthode colorimétrique qui permet de doser la concentration protéique d'un échantillon. Cette méthode est basée sur l'adsorption d'un colorant, le bleu de coomassie G250, qui se lie à des molécules de protéines à pH acide selon deux façons. Le groupe de triphénylméthane se lie aux résidus hydrophobes des acides aminés alors que les groupes sulfonâtes anioniques interagissent avec les chaînes latérales cationiques des protéines (les chaînes latérales de l'arginine, de la lysine et de l'histidine). Ceci entraîne la formation d'un complexe chromogène présentant un maximum d'absorption à 595nm. Il existe une corrélation entre la quantité de colorant formé dans une solution et la concentration en protéine [29].

La méthode de Bradford demande évidemment un étalonnage approprié. On utilise généralement de la BSA (Bovine Sérum Albumine) comme protéine standard à différentes concentrations (étalons). Cela permet d'établir une courbe d'étalonnage de la concentration en fonction de l'absorbance mesurée. Les concentrations utilisées pour cette gamme doivent être comprises dans la zone linéaire du colorant utilisé : ici entre 0.1 à 1.4mg/ml. Une fois les points correspondant à la gamme positionnés sur le plan on les relie par une droite approximant la linéarité de la courbe théorique. Pour se faire, plusieurs réactifs ont été préparés notamment le réactif de Bradford et la solution Stock de BSA (Bovine sérum albumine) (**voir annexe**).

II.1.5 Préparation et caractérisation des microcapsules

Les microcapsules ont été préparées par les Protocoles suivants :

- **Protocole expérimental de préparation**

A. des microcapsules chargées d'oxytétracycline par le procédé du complexe poly-électrolytique à base de gélatine et d'alginate de sodium

Dans un bécher équipé d'un agitateur mécanique on a préparé une émulsion d'eau dans l'huile (E / H) dite directe pour réaliser une complexation poly électrolytique en vue de préparer des microcapsules. En premier temps dans un récipient (bécher de 500 ml) on a versé 180 ml d'huile de tournesol qui est considéré comme phase huileuse sous chauffage à 60°C et sous une agitation mécanique à très grande vitesse. Par la suite on a ajouté 15 ml de solution de gélatine (7,0 % P/V) contenant une masse de 0.02g d'oxytétracycline, et dans le but de stabiliser cette dernière une quantité de 0.75g de Tween 80 dissous dans (10 ml) de l'eau été ajouté. On a versé également goutte à goutte dans la solution précédente 15 ml de solution d'alginate de sodium 2,0 % (P/V). Il est à noter que le rapport poids de l'alginate de sodium à la gélatine a été maintenu à 1,0:3,5 au cours de la préparation. Le pH du mélange a été ajusté à 3,7 en ajoutant 5 % (V/V) de la solution d'acide acétique glaciale à cette valeur de pH on obtient des microcapsules au sein du mélange. Ensuite le bécher contenant les microparticules a été laissé reposer à cette température pendant environ 15 minutes. Après le repos de la solution contenant les microparticules, le système a été ensuite refroidi à une température de 5 à 10 °C pour le durcissement des microcapsules. À la fin sous chauffage à 45°C suivi par une agitation on a versé progressivement 1.4 ml de formaldéhydes 37% pour la réticulation. L'agitation a duré 3 heures pour finir la réaction de réticulation. Les microparticules ont été filtrées et lavées par l'eau distillé. Les microparticules ont été aussi relavées avec de l'acétone pour enlever les traces de huile collée à la surfaces pour la conservation [30].

NB. Pour les capsules vides le même protocole a été effectué sauf qu'on n'ajoute pas de principe actif.

B. billes d'alginate chargées par microcapsules d'oxytétracycline et le lysozyme

Tout d'abord, l'alginate de sodium a été dissous dans l'eau distillée pour obtenir une concentration finale de 2 % (W/V). 4 ml de solution de lysozyme 70% (4 mg) et une quantité 1% (1g) des microcapsules préparé préalablement chargé on oxytétracycline ont été ajouté à la solution d'alginate 2%. Ensuite, le mélange a été déposé à travers une seringue dans une solution de coagulation de 100 ml contenant du chlorure de calcium (CaCl_2), Glutaraldéhyde (GA) et HCl sous agitation continue pendant 4 h (**figure 11**). Le Glutaraldéhyde et le HCl concentration contrôlée de 3 % en poids et de 0,1 % en poids, respectivement, et concentrations de CaCl_2 , 0,16 mol L⁻¹. Ont été enlevés par filtration puis lavés au moins six fois avec 100 ml d'eau distillée pour enlever tout Ca^{2+} libre et GA [31].

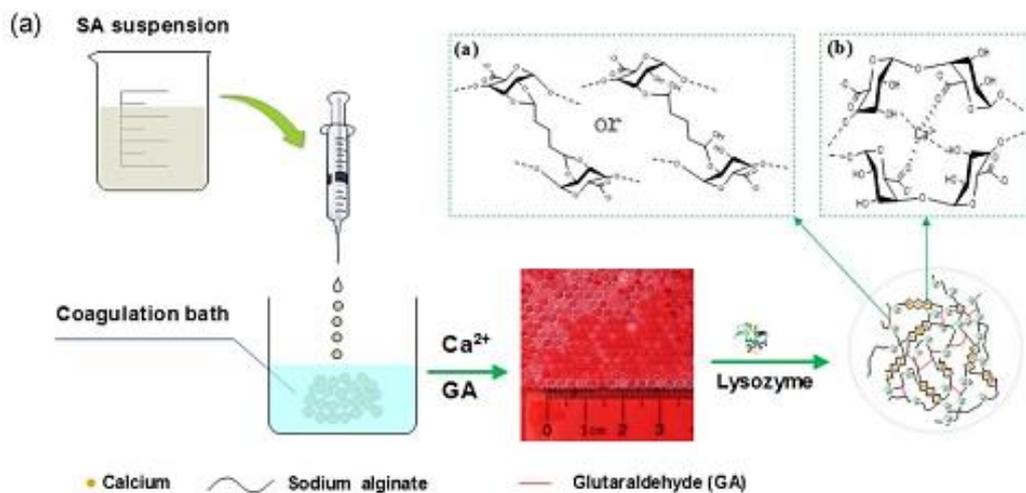


Figure 11: Illustration schématique pour la préparation des perles de gel alginate [31].

II.1.5.1 Méthode de caractérisation et d'analyses des microcapsules

II.1.5.1.1 Caractérisation spectroscopique dans le FT-IR

L'analyse FT-IR de la gélatine, l'alginate de sodium, et les microcapsules chargées d'oxytétracycline a été réalisée sur des pastilles de KBr, en dispersant l'échantillon dans la poudre de KBr puis comprimées la poudre de KBr à l'aide d'une presse hydraulique pendant 5 min, et passé pour l'analyse, de notre échantillon dans la poudre de KBr. Le spectre FT-IR de chaque

échantillon a été enregistré à température ambiante dans la plage de nombre d'onde 400-4000 cm^{-1} .

II.1.5.1.2 Caractérisation morphologique par microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB ou « Scanning Electron Microscopy » SEM) est une technique puissante d'observation de la topographie des surfaces. Elle est fondée principalement sur la détection des électrons secondaires émergents de la surface sous l'impact d'un très fin pinceau d'électrons primaires qui balaye la surface observée et permet d'obtenir des images avec un pouvoir séparateur souvent inférieur à 5 nm et une grande profondeur de champ [32].

Les microcapsules obtenues sont observées sous microscope électronique pour observer leur forme et leur morphologie avec précision. Des photos sont prises dans des grossissements appropriés. L'analyse microscopique a été effectuée au niveau de laboratoire d'analyse FUNDAPL pavillon 08 à l'université SAAD DAHLEB BLIDA 1.

II.1.5.1.3 Caractérisation par diffraction de rayons X (RDX)

La diffraction des rayons X (XRD, abréviation de l'anglais « *X-ray diffraction* ») est une technique sans effets destructeurs utilisées pour déterminer la structure cristallographie des solides étudiés. Elle consiste à envoyer des rayons X d'une longueur d'onde bien définie λ sur un échantillon. Les faisceaux sont diffractés par les plans cristallins de l'échantillon selon la relation de Bragg :

$$2 d_{hkl} * \sin \theta = n \lambda$$

On enregistre l'intensité détectée en fonction de l'angle de déviation 2θ du faisceau ; la courbe obtenue est un diffractogramme. La XRD est utilisée dans le domaine pharmaceutique pour vérifier la présence de polymorphisme ce qui concerne plus de 80% des molécules de principe actif [33]. L'analyse par diffraction des rayons X est une méthode qui permet aussi de vérifier la cristallinité de l'oxytétracycline, les microcapsules vides et les microcapsules chargées d'oxytétracycline. Cette analyse est effectuée à l'aide d'un diffractomètre de type BRUCKER ADVANCE D8.

II.1.5.2 Etude sur la libération de l'oxytétracycline et du lysozyme in vitro

Afin d'évaluer l'encapsulation de l'oxytétracycline et le lysozyme, des tests de libération in vivo dans deux milieux physiologiques simulés représentatifs ; le milieu gastrique SGF (pH =

1.2) et le milieu intestinale SIF (pH= 6.8) sont menés. L'évaluation de la quantité libérée est effectuée par la méthode spectrophotométrique UV-Vis. Afin de faciliter l'évaluation de l'oxytétracycline et le lysozyme libérée, on a procédé au préalable à l'établissement de la courbe d'étalonnage dans des milieux physiologiques appropriés. La préparation de ces milieux physiologiques a été effectuée selon la pharmacopée européenne 6e édition publiée le 16 juillet 2008.

- **Milieu gastrique**

Pour préparer le milieu à pH=1.2 on a introduit 250ml de chlorure de sodium (Na Cl) 0,2M dans une fiole jaugée de 1000ml, on ajoute 425ml d'acide chlorhydrique (HCl) 0,2M puis on complète au trait de jauge avec de l'eau distillée.

- **Milieu intestinal**

Pour préparer le milieu au pH=6.8 on a introduit 250ml de dihydrogéo-phosphate de potassium (KH₂PO₄) 0,2M dans une fiole jaugée de 1000ml, on ajoute 425ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0.2M puis on complète au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Les billes d'alginate chargée en OTC/ LYS sont dispersées dans 100 ml de SGF pH= 1.2 qui est maintenue sous agitation pendant 2h à 37°C condition des fluides gastriques. Ensuite, on effectue des prélèvements de surnageant chaque 10 min à l'aide d'une seringue pour l'oxytétracycline on mesure l'absorbance par un spectrophotomètre UV visible à 354 nm. Et dans le cas de lysozyme on prélève 100 µl de surnageant à l'aide d'une micropipette, on ajoute ensuite 3 ml de réactif de Bradford et laisser incubé pendant 15 min ensuite, la lecture a été faite à 595 nm. Les résultats sont représentés sous forme d'une courbe cinétique de libération en fonction de temps [34] [35].

Remarque : Le même protocole utilisé pour le milieu intestinal SIF pH= 6.8.

II.1.6 Préparation d'un onguent

On mesure une quantité de 100 ml d'huile à utiliser pour l'onguent (80% huile de coco et 20% huile d'olive). Tout d'abord on a fondu l'huile de coco dans un récipient en verre placé sous un bain-marie, après la fusion totale on a rajouté l'huile d'olive. En obtenant un mélange homogène des huiles on a ajouté 12g de cire d'abeille découpée en petits morceaux. Pendant que la cire fond on remue régulièrement à l'aide d'une spatule en inox le mélange obtenu et on continue à chauffer jusqu'à l'obtention d'une solution totalement homogène sans aucune trace des morceaux de cire. On a préparé 5 petits pots pour les remplir soigneusement d'onguent afin d'éviter que de l'eau ne

se retrouve dans les pots. On ajoute 5% des capsules respectivement aux petits pots (capsules chargé lysozyme, capsules chargé oxytétracycline, billes d'alginate chargé oxytétracycline et lysozyme, capsules vides et un pot ne contient pas des capsules). On a ensuite rajouté l'huile essentielle (la lavande : 2 ou 3 gouttes d'huile par pot suffit) en tant que parfum dans nos onguents, en maintenant l'agitation à l'aide de baguettes en bois. On laisse les onguents refroidir, sans couvercles sur les pots et lorsque les onguents atteignent le refroidissement à ce moment-là on ferme les pots. On les stocke dans un endroit frais, sec et à l'abri de la lumière.

II.1.7 Analyse microbiologique

Nous avons étudié l'activité antibactérienne du lysozyme (du blanc d'œuf) sur les souches bactériennes suivantes : *S. aureus*, *S. épardimidis* et *E. coli*, respectivement en tant que représentant des bactéries à gram positif et gram négatif par la méthode de diffusion en puits sur un milieu gélosé de type Muller Hinton (MH).

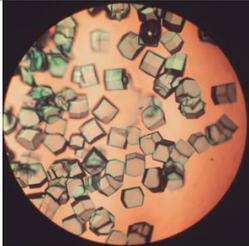
L'activité antibactérienne des substrats actifs (OTC & lysozyme) à l'état libre ou encapsulés, utilisés en faible concentration de l'ordre de milligrammes par ml, est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits. Nous avons considéré une souche comme étant sensible si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 10 mm ; résistante si le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 10 mm. La sensibilité est intermédiaire si le diamètre est égal à 10 mm.

II.2 Résultats et discussion

II.2.1 Caractérisation de base

Les caractéristiques de base des principaux substrats actifs utilisés dans cette étude sont présentées dans le tableau suivant. Cependant, il est important de signaler que le blanc d'œuf n'est pas une substance pure mais un mélange de protéines contenu dans une matrice d'eau. Le lysozyme est présent parmi ces protéines.

Tableau 4: Caractéristiques de base de l'oxytétracycline et du blanc d'œuf.

Caractéristique	Oxytétracycline	Lysozyme / blanc d'œuf
Aspect	poudre cristalline	liquide épais
Couleur	jaune	Transparente
Odeur	inodore	caractéristique
pH	3.6	9.0
Solubilité	soluble dans l'eau, peu soluble dans le blanc d'œuf	soluble dans l'eau
Photographie d'OTC Et Observation par microscope de LYS		

II.2.2 Caractérisation spectroscopique

II.2.2.1 Caractérisation spectroscopique dans l'UV-Vis

Les spectres caractéristiques des solutions d'oxytétracycline et du blanc d'œuf sont présentés dans la figure suivante :

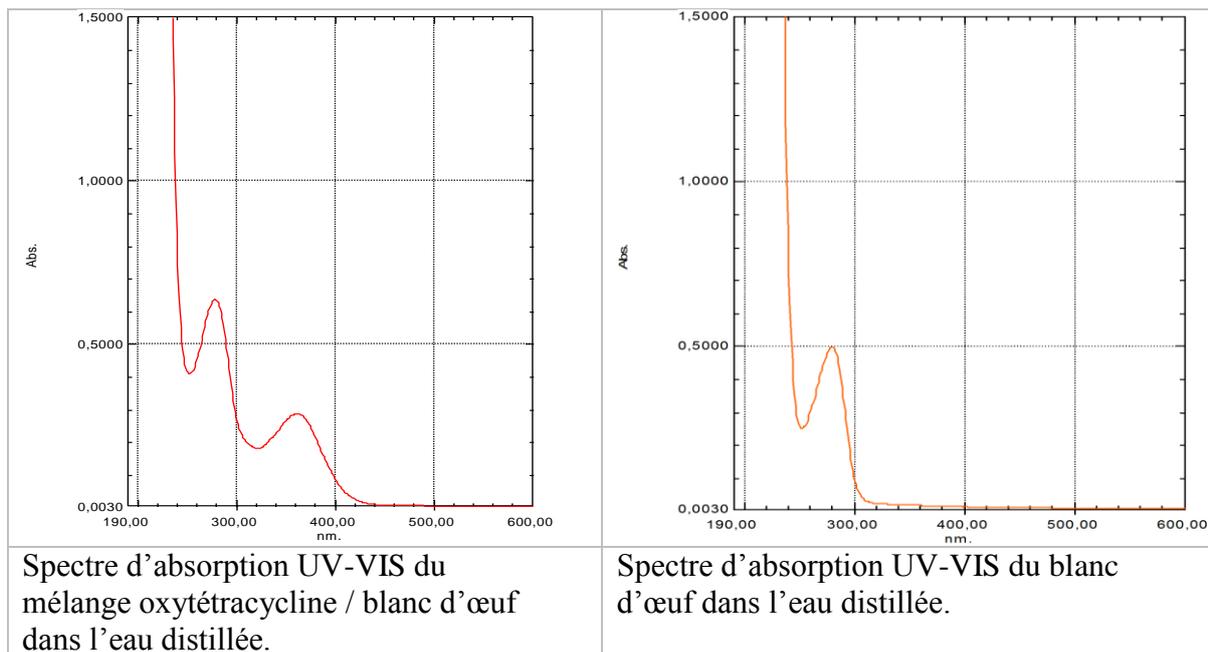


Figure 12: Caractéristiques spectrales UV-Vis de l'OTC et du Blanc d'œuf.

Le spectre du mélange oxytétracycline-blanc d'œuf dans le milieu aqueux présente, comme le montre la figure précédente, deux pics caractéristiques, le premier se trouve à une longueur d'onde de 280 nm et il provient d'une bande d'absorption du blanc d'œuf et le second apparaît vers 354 nm caractérisant une bande d'absorption de l'oxytétracycline.

Dans le cas de l'oxytétracycline (substance pure), une méthode de dosage précise a été vérifiée sur la base de ses propriétés spectroscopiques d'absorption dans l'UV-Vis. En effet, une droite d'étalonnage a été établie en effectuant des mesures d'absorbance à une longueur d'onde correspondant à $\lambda = 354$ nm en utilisant plusieurs solutions étalons. Cette droite est présentée dans la figure suivante et sera notre référence principale dans toutes les mesures de quantification de cet antibiotique.

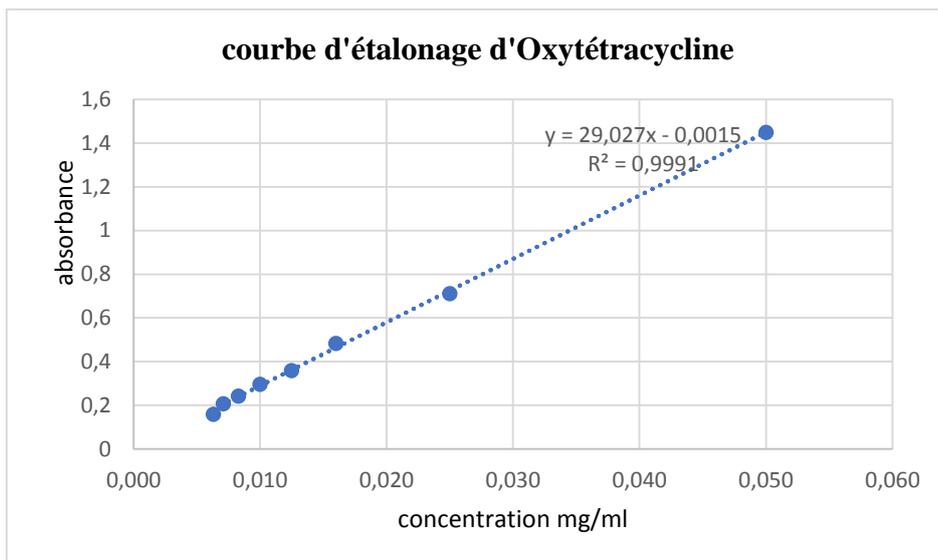
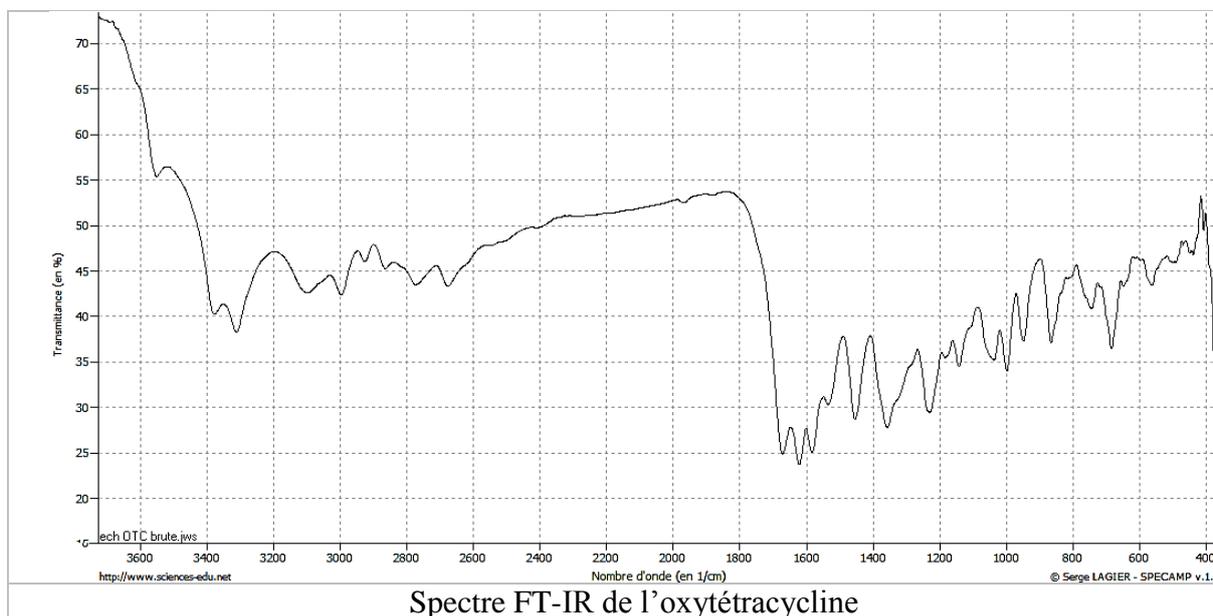


Figure 13: Courbe d'étalonnage dans l'UV-Vis de l'oxytétracycline dans l'eau distillée.

II.2.2.2 Caractérisation spectroscopique dans l'IR

Les spectres FT-IR de l'oxytétracycline et du blanc d'œuf enregistrés sont présentés dans La figure suivante :



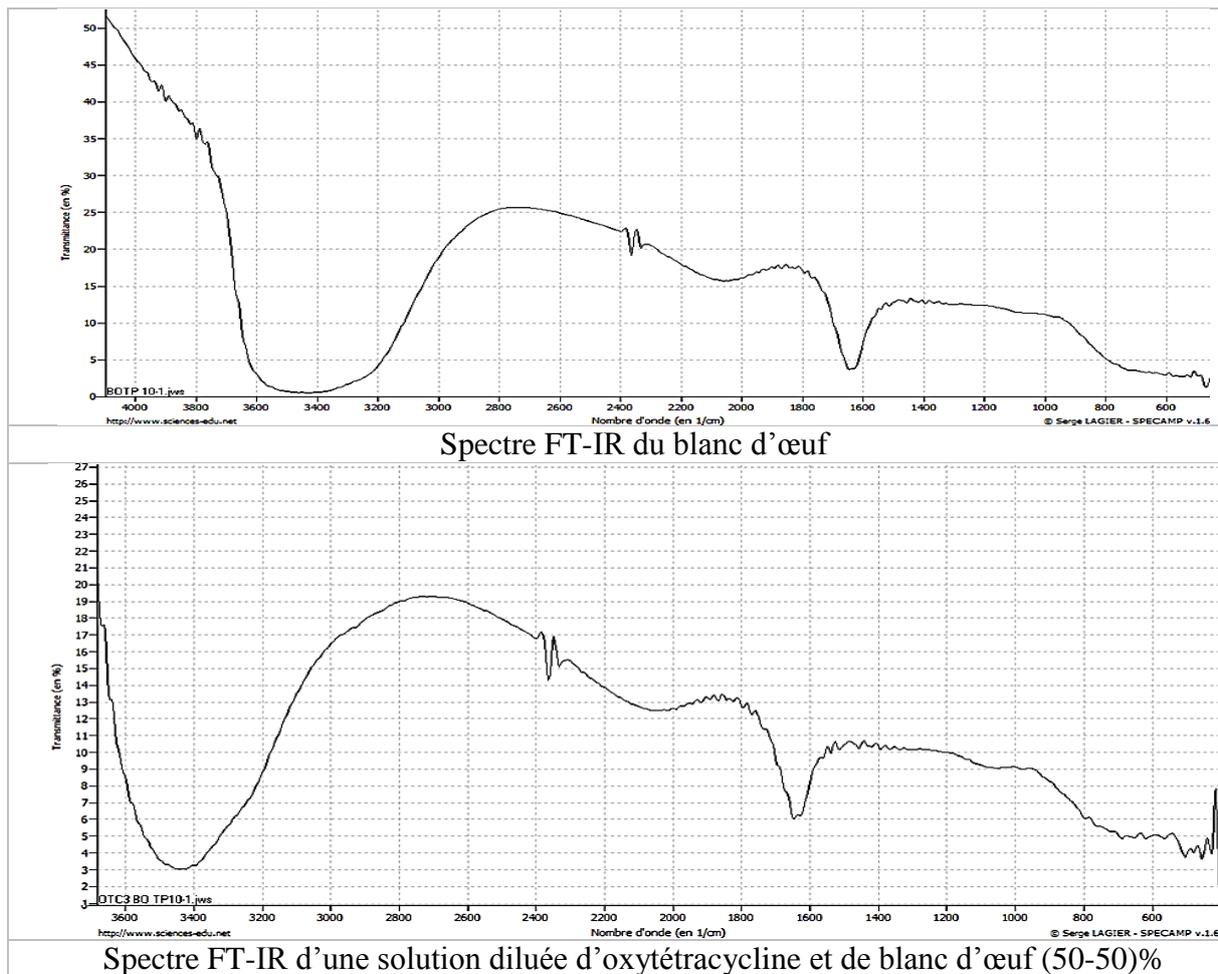


Figure 14: Spectres FT-IR de l'oxytétracycline et du blanc d'œuf.

Dans le spectre de l'oxytétracycline, les bandes d'élongation obtenues à 3590 et 3090 cm^{-1} proviennent des vibrations des groupements O-H (alcool et phénol) et amine N-H. La liaison C-H aromatique s'étendant à 3000 cm^{-1} . Les pics de vibrations à 2916, 2674 cm^{-1} sont attribués à l'élongation de CH_3 et $\text{C}=\text{C}$, respectivement. L'absorption du C-H aromatique apparaît à 1452 cm^{-1} et celles du groupement CH_3 sont observées à 1357 cm^{-1} . A 1247-1000 cm^{-1} , la bande d'absorption est attribuée à la liaison C-N aromatique. Le pic de vibration à 965 cm^{-1} provient normalement des vibrations d'élongation de cette même liaison. Les pics dus à la déformation de la liaison C-C dans le plan ont été identifiés à 567-501 cm^{-1} .

Dans le spectre du blanc d'œuf dilué, on observe une bande intense centrée entre 3 400 et 3 300 cm^{-1} en raison normalement de la présence des groupements O-H (milieu aqueux) et N-H (fonction amine due à la présence des protéines). Une bande d'absorption apparaît vers 1640 cm^{-1} et 1620 cm^{-1} et elle provient normalement des vibrations du groupement C=O. dans un blanc d'œuf

de référence, certains [36]. Indiquaient que des bandes d'absorption caractéristiques observées à 1646, 1631, 1587 cm^{-1} provenaient des vibrations du groupement C=O alors que l'amide-I (N-H) correspondait à 1594 cm^{-1} . Une bande d'absorption intense à 3280, 3295 était due aux vibrations de la liaison OH des protéines.

Le spectre FT-IR du mélange oxytétracycline/blanc d'œuf dilué dans l'eau n'est pas différent de celui obtenu pour le blanc d'œuf seul. En effet, on n'y voit pas les pics caractéristiques de l'OTC du fait de la forte dilution de celui-ci dans le mélange. En effet, l'interaction entre le lysozyme, qui est une macromolécule, et l'oxytétracycline peut être significative comme il a été démontré par certains auteurs [37]. Cette interaction qui n'est pas bien élucidé ici avec l'analyse FT-IR, serait, de toute évidence, à l'origine du comportement physico-chimique et antibiotique nouveau de la nouvelle entité formée (OTC-Lys.) et encapsulée. Ce constat mérite d'être étayé d'une manière plus approfondie dans une étude dédiée.

II.2.3 Extraction du lysozyme d'œuf de poule

Lorsque deux solutions aqueuses de certaines substances incompatibles telles que le polyéthylène glycol (PEG) et le sel, sont mélangés au-dessus d'une concentration critique, les mélanges de protéines ajoutés à ce système biphasé ont tendance à se déplacer inégalement entre les phases, ce qui permet l'extraction d'une protéine particulière. L'ATPS est avantageuse sur les autres techniques de séparation en raison de la haute teneur en eau des deux phases, ce qui signifie une grande biocompatibilité et une faible tension interfaciale, minimisant ainsi la dégradation des biomolécules. L'ATPS fournit également une bonne résolution, un rendement élevé et une capacité de séparation relativement élevée. En outre, ce système est facilement extensible. Le mécanisme régissant la répartition des biomolécules dans l'ATPS n'est toujours pas entièrement compris. On croit que la cloison différentielle est entraînée par des interactions de type Van der Waals, la liaison hydrogène et les interactions ioniques entre les biomolécules et la phase environnante. Par conséquent, la partition peut être influencée par les concentrations et la masse moléculaire du polymère en phase de formation, la concentration du sel formant la phase, le type et la concentration des sels ajoutés, la température et le pH. Le poids moléculaire, la forme, les sites de collage spécifiques, et l'hydrophobie de surface des biomolécules affectent également le comportement de cette répartition. En fait, les propriétés de surface, telles que la charge de surface des biomolécules sont probablement les facteurs les plus importants affectant les performances de séparation. Les sels ajoutés affectent la répartition des protéines dans ATPS en raison de la distribution différentielle des ions de sel dans les deux phases. Les sels ajoutés contiennent des

ions avec différente hydrophobicité, c'est-à-dire ions à différentes positions qui peut diriger le comportement de répartition des protéines. [26]

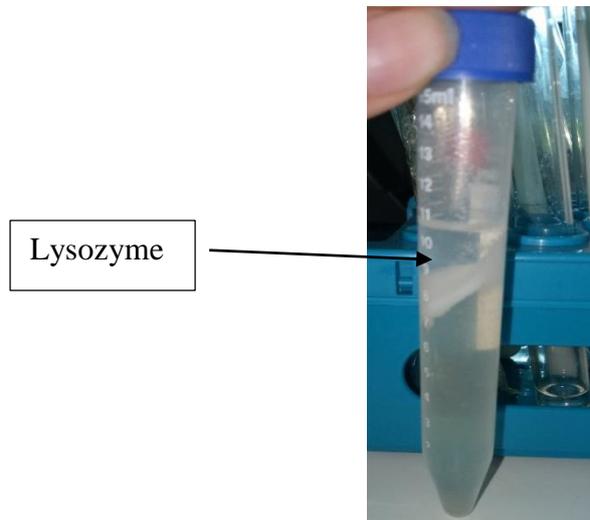


Figure 15: Surnageant de lysozyme après séparation et centrifugation.

L'analyse spectroscopique par FT-IR du surnageant préparé selon la méthode décrite précédemment et contenant normalement un concentrât de lysozyme.

Le spectre ci-dessous présente les caractéristiques spectrales habituelles d'une protéine (polypeptide). Une bande large et intense vers 3400 cm^{-1} provient de l'absorption des groupements hydroxyles (-OH) liés par liaison hydrogène. Il s'agit là probablement de l'interaction de l'eau (abondant) avec l'enzyme. Les pics (02) observés respectivement à $1650\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ correspondent à la liaison N-H (amines primaire dans la fraction amide c-à-dire associé à C=O) alors que le pic observé à environ 1100 cm^{-1} peut être attribué aux vibrations de la liaison C-N.

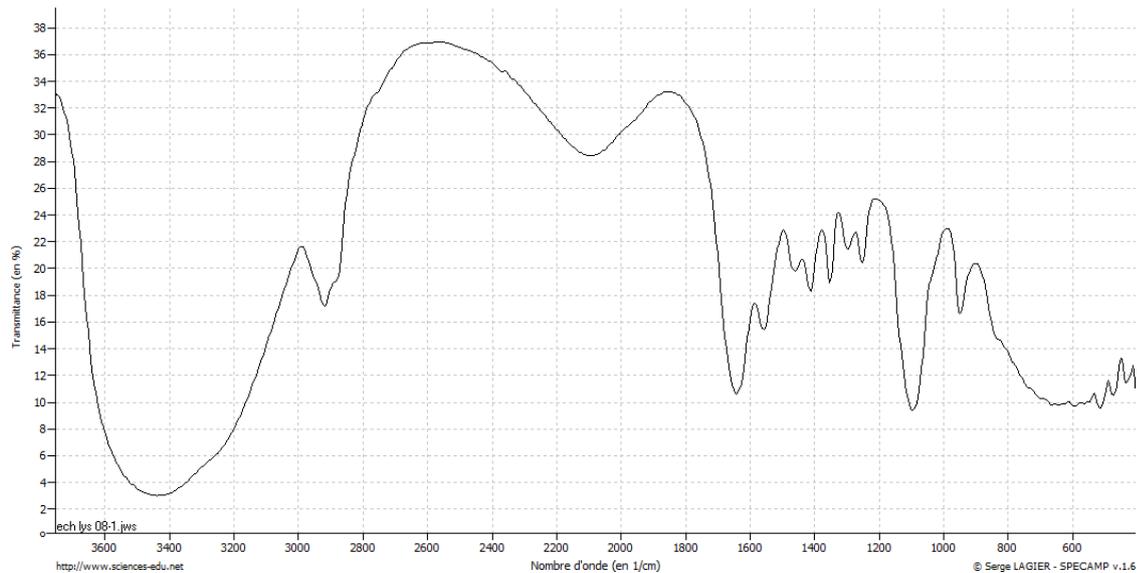


Figure 16: Spectre FTIR du lysozyme extrait du blanc d'œuf de poule.

II.2.3.1 Dosage des protéines par la méthode de Bradford

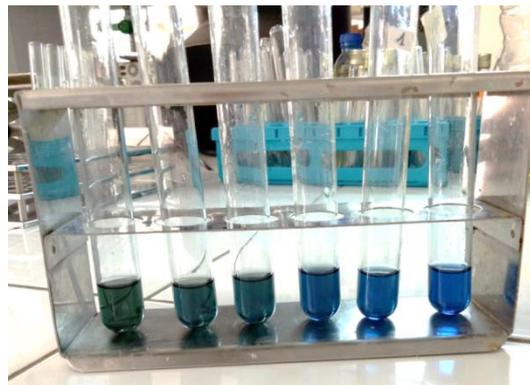


Figure 17: Coloration dans le dosage des protéines par la méthode de Bradford.

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode colorimétrique de Bradford. Pour doser les protéines des diverses fractions, il est nécessaire de disposer d'une référence que constitue la courbe d'étalonnage absorbance (595nm) = f (mg de protéine par tube). Cette courbe d'étalonnage réalisée à partir de la solution de sérum albumine bovine (BSA) à 2 mg/ml nous a permis de déduire l'équation de la droite à partir de laquelle les concentrations protéiques de nos échantillons ont été calculées.

II.2.3.1.1 Protocole expérimental

➤ Préparation des dilutions de BSA

La première étape consiste à la réalisation d'une série de dilutions de différentes concentrations connues à partir de la solution mère comme l'indique le tableau ci-dessous.

Tableau 5: Préparation des dilutions de la solution mère (Volume total = 2ml).

	T 0,15	T 0,25	T 1	T 1,4
BSA Stock, (2mg/ml)	0,15ml	0,25ml	1ml	1,4ml
Eau distillée	1.85ml	1,75ml	1ml	0,6ml
Concentration, BSA en mg/ml	0,15	0,25	1	1,4

➤ Préparation de la gamme étalon

La deuxième étape consiste à utiliser cinq points pour tracer la droite pour un volume réactionnel total de 3.1ml par échantillon (voir **Tableau 6**).

Tableau 6 : Préparation des échantillons à doser (Volume Totale=3,1ml).

N° du Tube	Volumede BSA (ml)	[BSA] des Dilutions (mg/ml)	Réactif de Bradford (ml)
1(Blanc)	0,1	0	3
2	0,1	0,15	3
3	0,1	0,25	3
4	0,1	1	3
5	0,1	1,4	3

La mesure de l'absorbance a été réalisée avec le spectrophotomètre SHIMADZU UV-1201. L'absorbance de tous les tubes est mesurée à une longueur d'onde de 595nm. Les valeurs obtenues à partir des tubes de la gamme étalon permettent de tracer une droite d'étalonnage. Les échantillons sont préalablement mis à l'obscurité pendant 15minutes avant de mesurer l'absorbance afin que l'équilibre de fixation Protéine-colorant s'établisse. Le pigment forme alors un complexe avec les protéines, sa structure est modifiée par cette interaction et sa longueur d'onde d'absorbance maximale est déplacée de 465 à 595nm.

○ **Préparation des échantillons de lysozyme à doser :**

Pour évaluer la concentration des protéines qui sont présentes dans le surnageant obtenu à partir des extraits du blanc d'œuf, il suffit d'utiliser le même volume que celui utilisé pour les points de la gamme (volume total et volume du réactif), d'en lire l'absorption à 595 nm au spectrophotomètre puis d'en reporter la mesure sur la courbe étalon qui nous donne la concentration correspondante. Quatre dilutions à différents volume (10µl, 50µl, 70µl, 100µl) ont été réalisées. Dans le premier tube, on prélève 10µl du surnageant au quel on ajoute, 90µl d'eau distillée et 3ml du réactif de Bradford et ainsi de suite pour les autres tubes (voir **Tableau.7**).

Tableau 7: Préparation des échantillons du Surnageant de lysozyme.

N° du Tube	Volume du surnageant de Lys.	Volume d'eau ajouté	Réactif de Bradford
1	10µl	90µl	3ml
2	50µl	50µl	3ml
3	70µl	30µl	3ml
4	100µl	0µl	3ml

L'équation se présente sous la forme :

$$Y = 0.7669 X + 0.0962 \text{ (avec } Y = \text{absorbance et } X = \text{concentration protéique).}$$

Etant donné que les échantillons ont été dilués, le calcul de la concentration protéique doit prendre en considération le facteur de dilution. Dans ce cas :

$$[X] = [(Y/0.7669) - 0.0962] * Fd \quad (Fd : \text{facteur de dilution})$$

Une fois cette équation déterminée, le calcul de la concentration protéique des échantillons se fait aisément comme le montre les tableaux ci-dessous :

Tableau 8: Absorbance et concentration protéique d'échantillon de lysozyme.

Volume d'échantillon	Absorbance	Facteur de Dilution	Concentration [mg/ml]
10µl	0.825	0.1	0,098
50µl	0.967	0.5	0,582
70 µl	1.099	0.7	0.936
100µl	1.156	0	1,411

Les résultats obtenus sont satisfaisants puisqu'ils révèlent d'une part, la présence d'une quantité importante de protéines dans l'échantillon. La séparation a été effectuée à un pH égal à 10. Cette valeur correspond au point isoélectrique du lysozyme. Ce réajustement du pH a favorisé la séparation du lysozyme et a donné lieu à de très bons résultats puisqu'il nous a permis de récupérer après la centrifugation une quantité importante de culot donc du lysozyme.

II.2.4 Préparation des microcapsules

II.2.4.1 Caractérisation morphologique par microscopie électronique

Les microcapsules préparées selon la méthode décrite précédemment ont été observées par microscopie électronique. De taille relativement petite allant de quelques centaines de nanomètres à quelques microns, ces particules étaient relativement sphériques dans leur forme, comme il est présenté dans la figure ci-dessous. Cependant, à l'état libre, c'est-à-dire non chargées en principe actif, une forte agglutination est observée, en (a). Ce phénomène, normalement indésirable, demeure incompréhensible pour nous, mais nous pensons qu'une forte réticulation des bios macromolécules utilisées en est responsable. Des travaux expérimentaux conséquents sont demandés ici pour mieux comprendre et gérer ce phénomène.

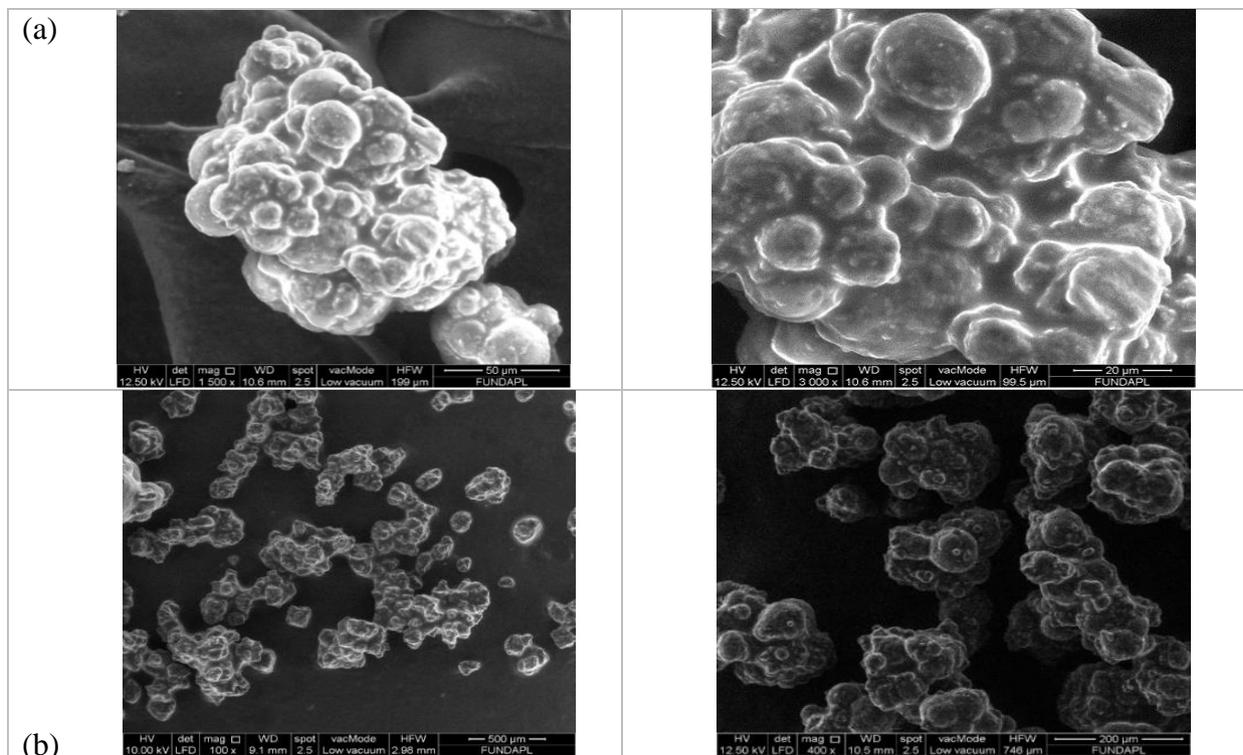


Figure 18: Micrographies par MEB des microcapsules obtenues par coacervation.

(a), des microcapsules vides ;(b), des microcapsules chargées en oxytétracycline.

A titre de comparaison, des capsules de taille plus grande ont été préparées par gélification ionotropique faisant appel uniquement aux alginates en tant que constituant de l'enveloppe polymérique. De forme quasiment sphérique et de taille de quelques centaines de microns (comme le montre les figures ci-dessous), ces capsules peuvent être obtenues d'une manière relativement facile et chargées à façon par différents principes actifs ; ici le lysozyme et les microcapsules d'oxytétracycline. Par microscopie électronique (**Figure 21**), on peut démontrer que ces capsules sont du type réservoir. En effet, une cavité pouvant d'être remplie est clairement observée.

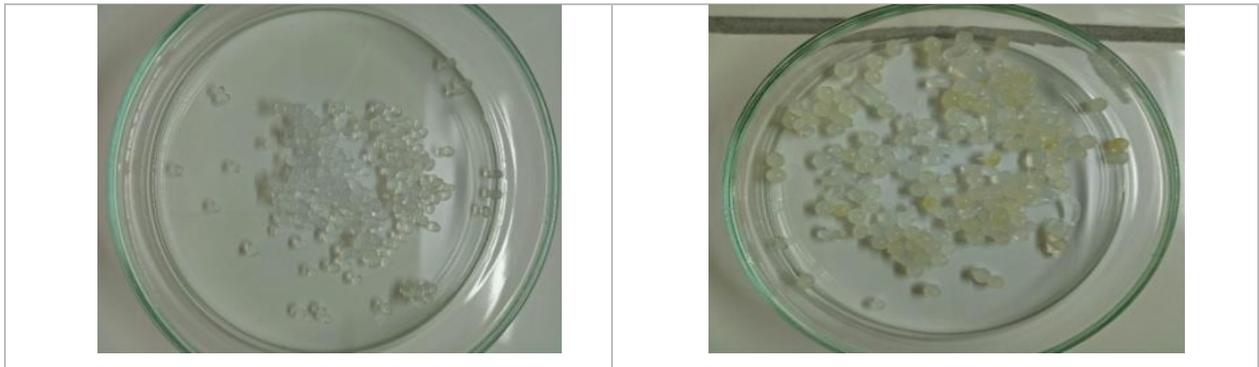


Figure 19: Photos des billes d'alginates : en (A), vides; en (B) chargées de lysozyme.



Figure 20: Photo des billes d'alginates sèches chargées de lysozyme et 1% de microcapsules chargées d'OTC.

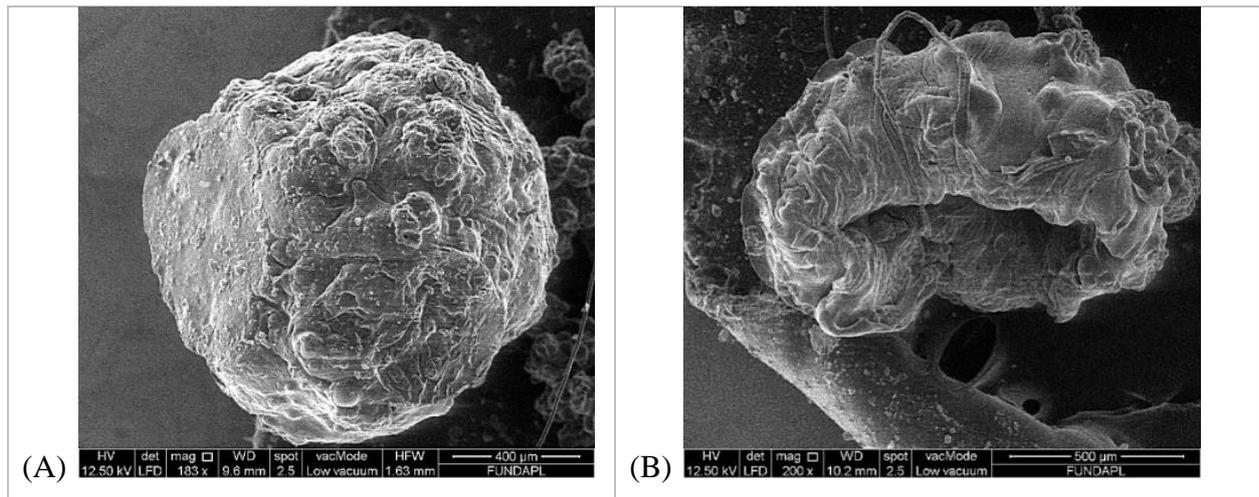


Figure 21: Micrographies par MEB des billes d'alginate contenant les microcapsules d'oxytétracycline : (A) forme sphérique ; (B) une découpe.

II.2.4.2 Caractérisation par diffraction rayon X (voir l'annexe)

II.2.4.3 Caractérisation spectroscopique dans l'infrarouge des microcapsules

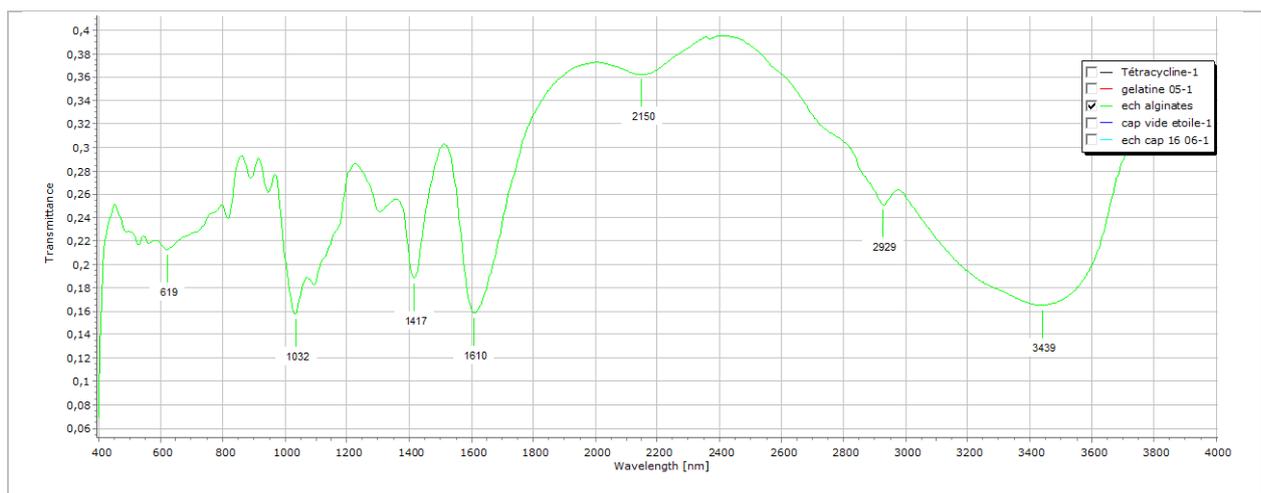
Une investigation de nature spectroscopique a été effectuée lors de la préparation des microcapsules avec le système alginate-gélatine selon la procédure déjà décrite. Bien évidemment, les spectres des biomatériaux utilisés ont été pris les premiers. Présentés dans les deux figures ci-dessous, on peut très bien attribuer des bandes d'absorption caractéristiques à la structure de chacune des deux macromolécules.

Le spectre de FTIR de l'alginate (**figure 22**), montre des bandes d'absorption à 3442, 2932 1619 et 1417 cm^{-1} la sont assignés à vibrations OH fonction hydroxyle, et asymétrique-symétrique $-\text{COO}$ fonction carboxyle, respectivement. La bande à 1091 cm^{-1} est due à la fonction C-O des groupes d'éther et la bande à 1027 cm^{-1} est assignée à C-O des groupes hydroxyles.

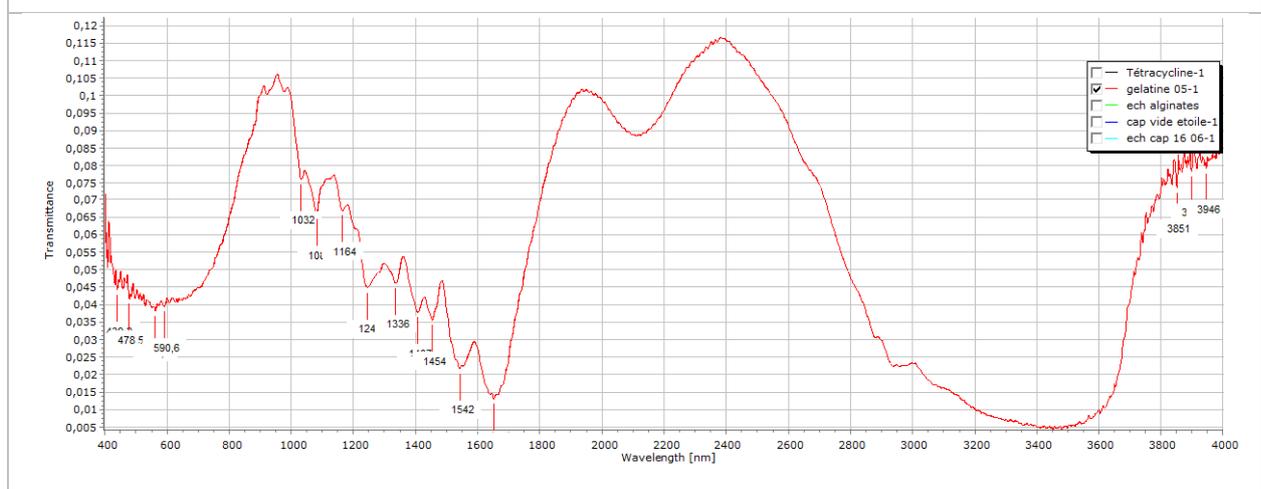
Le spectre infrarouge de la gélatine qui montre plusieurs bandes caractéristiques. La première région correspond aux vibrations de valence des NH qui apparaissent aux alentours de 3441 cm^{-1} . Un pic à 2936 cm^{-1} correspond à un groupement C-H alcènes, et à 2875 cm^{-1} représente un groupement C-H alcanes. On observe aussi à 1651 cm^{-1} le groupement carbonyle C=O de l'amide primaire (l'amide I) et une deuxième à 1540 cm^{-1} de l'amide II correspondant à l'élongation C-N le pic à 1241 cm^{-1} correspond à l'amide III qui est attribuée aux vibrations des groupements C-N et N-H de l'amide liée. Par contre, les bandes qui apparaissent à 1164 cm^{-1} et

1076 cm-1 correspondent à la vibration d'élongation C–O. La bande située à 612 cm-1 est due aux vibrations de balancement des NH.

Concernant le complexe polymérique fabrique (membrane de la microcapsule), un pic caractéristique pour l'amide dans la région de 1500–1650 cm⁻¹ est apparu dans le complexe (1646 cm-1 en raison de l'étirement de C=O pour l'amide) et la formation confirmée de complexe en raison de la réaction entre le groupe amine de la gélatine et le groupe carboxylique de l'alginate. En outre, le déplacement du pic de l'amide I de 1651 cm-1 à 1646 cm-1 observés dans les microparticules complexes de gélatine et d'alginate de sodium ont également indiqué que les groupes négatifs d'alginate pourrait s'associer à la gélatine chargée positivement. En outre, clairement expliqué, la zone carbonyle divisée en trois pics clairs à 1748 cm-1, 1646 cm-1, 1534 cm-1, qui pourrait être assigné à la C-O étirant les vibrations, et aux groupes NH₃⁺ et COO caractéristiques du complexe Interpol électrolyte dans son ensemble décrit dans la littérature



Spectre FT-IR de l'alginate



Spectre FT-IR de la gélatine

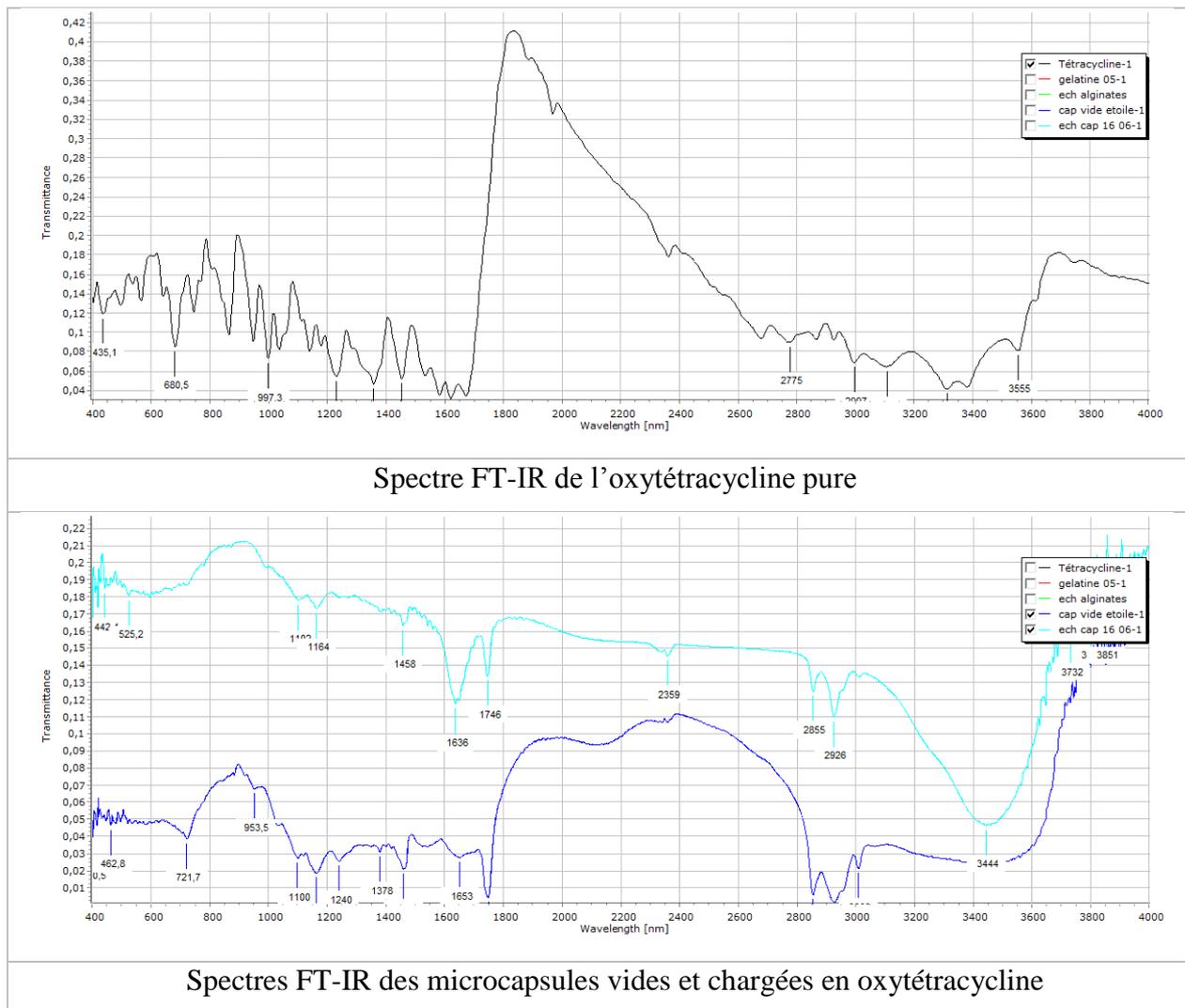


Figure 22: Spectres FT-IR obtenus des différents composés constituant les microcapsules élaborées selon la méthode de coacervation complexe.

II.2.5 Evaluation de l'activité antibactérienne

A. Par la méthode de disque :

L'étude de la sensibilité des bactéries a été réalisée par la méthode du disque. En effet, un disque de papier buvard est au préalable imprégné dans les solutions d'antibiotique (oxytétracycline, 0.25 mg/l) et de notre bioactif (blanc d'œuf dilué dans l'eau distillée), comme il a été déjà mentionné en **II.1.7**. Le disque est déposé à la surface d'un milieu géloséensemencé par les bactéries modèles (**figure 23**) fournies par le laboratoire de microbiologie de SAIDAL Antibiotical (Médéa). Les microorganismes suivants ont été testés : *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomycès cerevisiae*. L'évaluation de la zone d'inhibition est observée après 24 heures.

Dans la (figure 24) nous avons présenté quelques-uns des résultats obtenus après incubation. Il est important de signaler que l'effet antibactérien observé est très significatif avec les souches du genre *Bacillus* et *Staphylococcus* sur lesquels même le blanc d'œuf présente une activité. Des mesures détaillées à ce propos sont consignées dans le tableau 9. Par ailleurs, une absence totale d'inhibition (activité) a été observée avec *Sacchromycèse cerevisiae* qui est en fait une levure. Il apparait aussi qu'une solution de blanc d'œuf seule agit sur *Staphylococcus epidermidis* et *Bacillus subtilis*.

A travers les résultats obtenus, on remarque que les zones d'inhibition obtenue pour l'oxytétracycline sont fortes par rapport au celle de blanc d'œuf qui a un effet que sur les bactéries de gram positif. Par contre il n'a pas un effet sur le champignon *Saccharomycèse cerevisiae* donc pas d'inhibition.

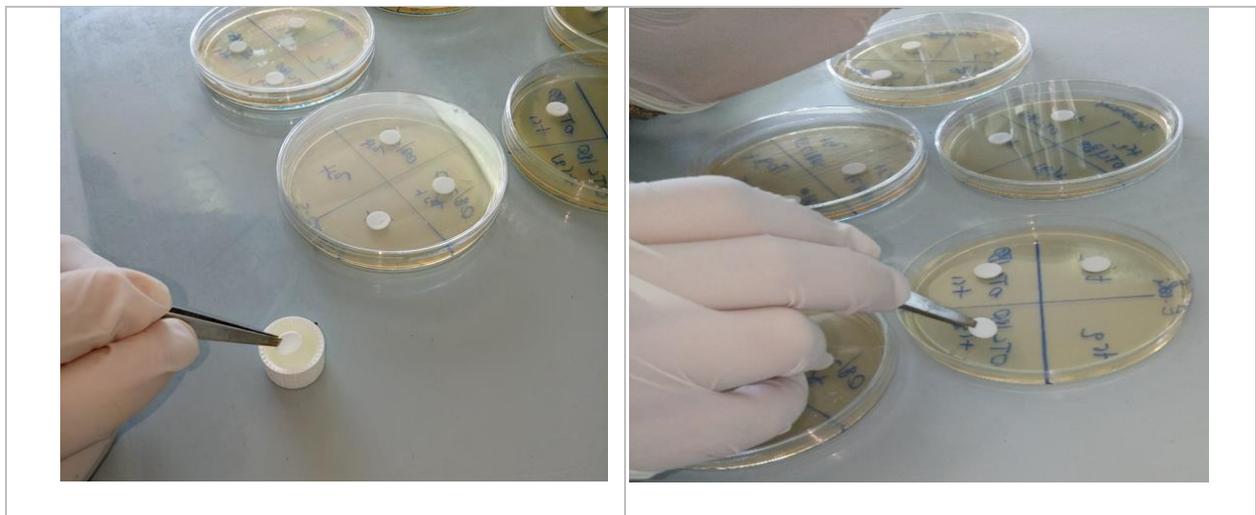


Figure 23: Émersion des disques dans l'antibiotique puis les déposés délicatement sur la suspension



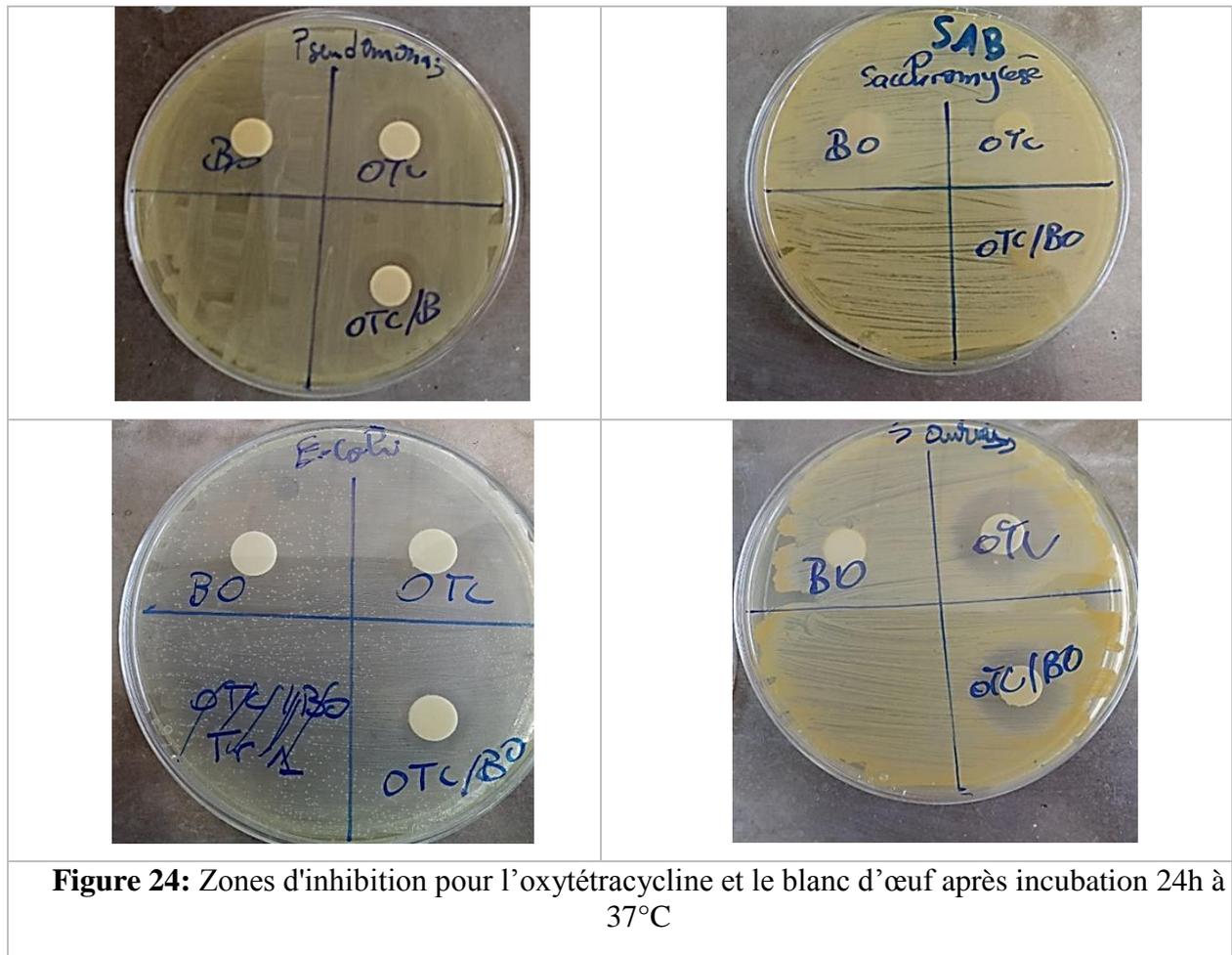


Tableau 9 : Diamètre d'inhibition mesuré avec des souches testées par le lysozyme et l'oxytétracycline.

Souches Bactériennes	PA	Activité	Diamètre d'inhibition	Observation
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+OTC	+	23mm	Inhibition
	+BO	+	15mm	Inhibition
	+OTC/BO		20mm	Inhibition
<i>Bacillus subtilis</i>	+OTC	+	30mm	Inhibition
	+BO	+	12mm	Inhibition
	+OTC/BO		27mm	Inhibition
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+OTC	+	16mm	Inhibition
	+BO	-	0	-
	+OTC/BO	+	16mm	Inhibition
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+OTC	-	0	-

	+BO	-	0	-
	+OTC/BO		0	-
<i>Escherichia coli</i>	+OTC	+	18mm	Inhibition
	+BO	-	0	-
	+OTC/BO		14mm	Inhibition
<i>Staphylococcus aureus</i>	+OTC	+	22mm	Inhibition
	+BO	-	0	-
	+OTC/BO	+	20mm	Inhibition

B. Par la méthode de diffusion en puits

B.1 : Caractérisation antibactérienne de lysozyme

○ Principe :

Pour la mise en évidence de l'action lytique du lysozyme par les souches tests, nous avons choisi la méthode de diffusion des puits. Cette méthode est basée sur le principe que cette substance protéique est capable de diffuser dans un milieu de culture solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible. Cette action lytique se manifeste par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits (voir **Figure 25**).

○ Les souches bactériennes utilisées :

Les souches bactériennes utilisées ont été fournies par le laboratoire de microbiologie d'hygiène sont : *Staphylococcus Epiderme ATCC 12228*, *Escherichia coli ATCC 8739* et *Staphylococcus aureus ATCC 6538* fournie par le laboratoire d'hygiène de Blida.

○ Protocole

Cette méthode est réalisée sur la gélose MH, le milieu de culture stérile et fondu est versé aseptiquement dans les boîtes de pétri avec une épaisseur de 4mm dans chaque boîte. Après solidification, et à l'aide d'un écouvillon stérile, la surface du milieu de culture estensemencé par l'une des suspensions de souches bactériennes. Les puits sont réalisés à la surface à l'aide d'une pipette pasteur, par la suite une quantité de 100µl (lysozyme) est déposé aseptiquement dans ces puits. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h. L'évaluation de l'inhibition est réalisée par mesure du diamètre d'inhibition.

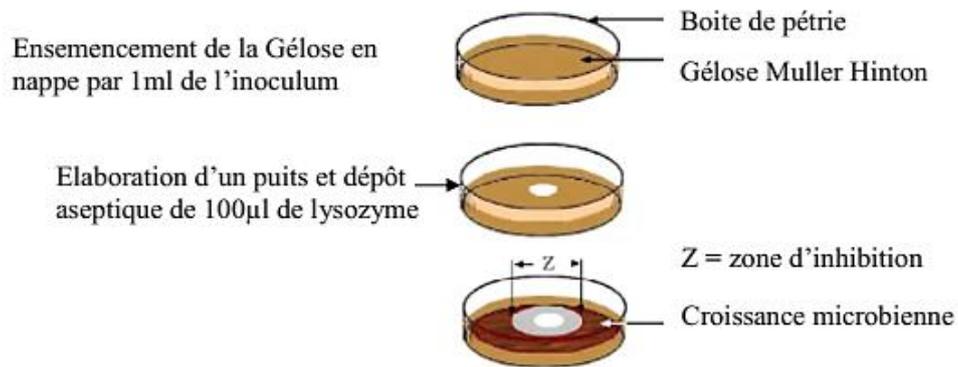


Figure 25: Schémas Représentatif de la méthode des puits.

○ **Résultats du test microbiologique**

Tableau 10: Diamètre d'inhibition des souches testées par le lysozyme.

Souches Bactériennes	PA	activité	Diamètre d'inhibition	Observation
<i>Escherichia Coli</i>	Lys à 100%	-	-	-
	Lys à 70%	-	-	-
<i>Staphylococcus A.</i>	Lys à 100%	+	15mm	Inhibition
	Lys à 70%	+	20mm	Inhibition
<i>Staphylococcus Ep</i>	Lys à 100%	+	13mm	Inhibition
	Lys à 70%	+	27mm	Inhibition

B.2 : Caractérisation antibactérienne des billes d'alginate

Tableau 11: Diamètre d'inhibition des souches testées par les billes d'alginate.

Souches Bactériennes	PA	activité	Diamètre d'inhibition	Observation
<i>Escherichia Coli</i>	cap vides	-	-	-
	cap Lys	-	-	-
	cap OTC	+	16mm	Inhibition
	cap OTC/ Lys	+	20mm	Inhibition
<i>Staphylococcus A</i>	cap vides	-	-	-
	cap Lys	+	27mm	Inhibition
	cap OTC	+	18mm	Inhibition

	cap OTC Lys	+	20mm	Inhibition
<i>Staphylococcus Ep</i>	cap vides	-	-	-
	cap Lys	+	24mm	Inhibition
	cap OTC	+	18mm	Inhibition
	cap OTC Lys	+	26mm	Inhibition

II.2.6 Résultats de la libération de l'oxytétracycline et du lysozyme

Afin d'estimer les vitesses de libération de l'oxytétracycline et du lysozyme à partir de leur état encapsulé dans les milieux biologiques, des profils cinétiques ont été déterminés dans des milieux biologiques simulant les fluides gastrique (SGF : simulated gastric fluid) et intestinal (SIF : simulated intestinal fluid). Ces mesures ont été conduites en fonction du temps (cinétique) à 37 °C.

De telles mesures sont à même de nous permettre de prédire l'activité des agents actifs dans des conditions réelles lorsque l'influence d'un certain nombre de facteurs opérationnels est complètement comprise et maîtrisée. En effet, dans ces cas, la compréhension des mécanismes de libération est hautement souhaitée.

D'après les résultats obtenus (figures ci-dessous), il est clairement démontré que la libération de l'OTC est relativement rapide et quantitative dans les deux milieux biologiques simulés. Un taux de libération de l'ordre de 100% est atteint après environ deux heures à 37 °C pour les deux principes actifs (OTC/ LYS) dans le SIF. Par ailleurs, il semble que cette libération est encore moins rapide dans le SGF (pH acide) où une libération totale est obtenue à 130 min. Normalement, à ce pH, l'OTC deviendrait plus soluble (voir **figure 28**) du fait de la présence prépondérante d'espèce dérivée cationique comme OTC^+ : ($\text{OTC}^+ = \text{OTC} + \text{H}^+$ log pka = -3.37). Bien évidemment, il est convenable ici de multiplier ce type d'expériences pour confirmer précisément nos propos.

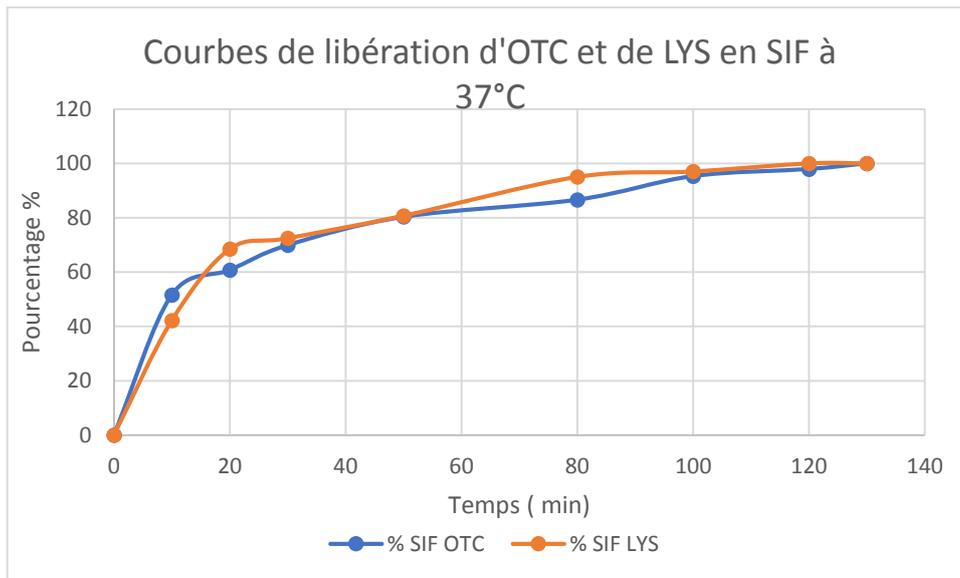


Figure 26: Profile de libération de l’oxytétracycline et de lysozyme dans le SIF, à 37°C.

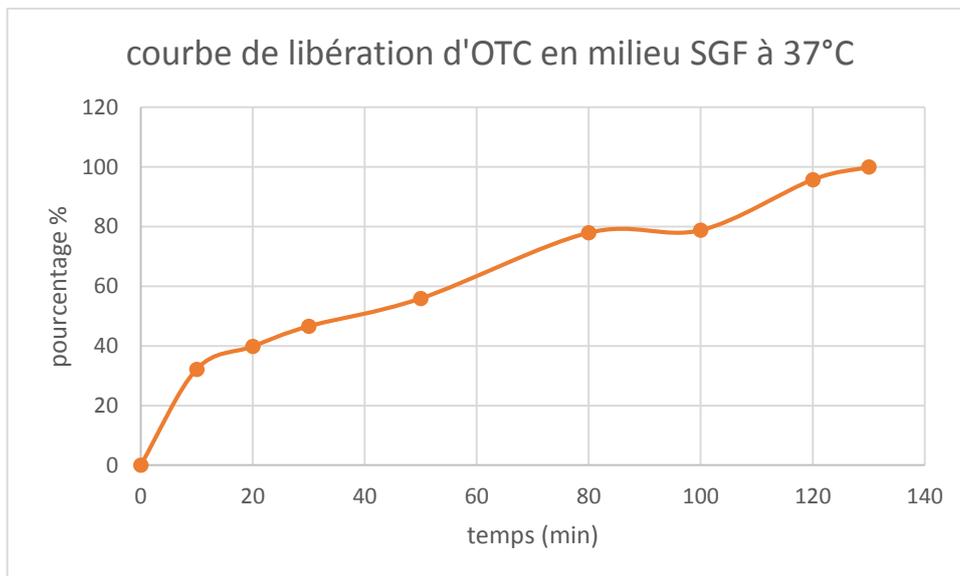


Figure 27: Profile de libération de l’oxytétracycline dans le SGF, à 37°C.

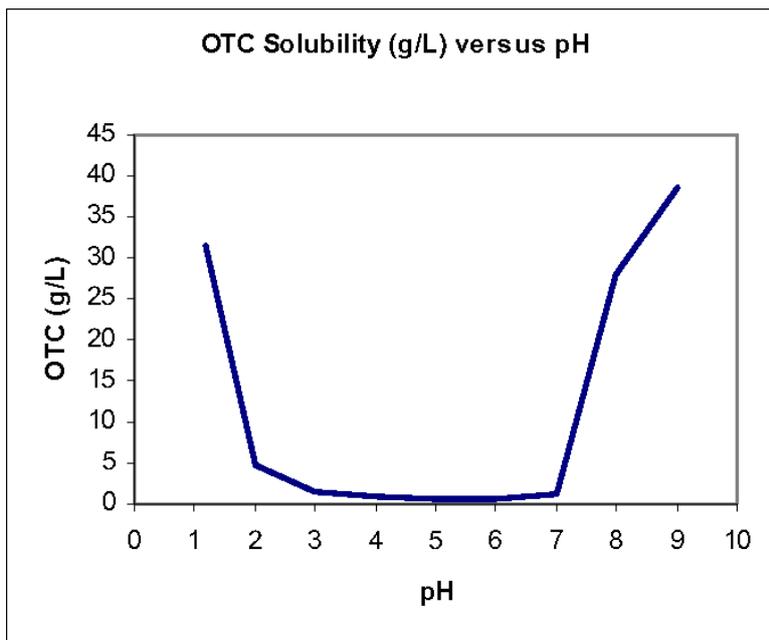


Figure 28: Solubilité de l’OTC en fonction du pH, d’après Mitscher [38].

Concernant le lysozyme, il semble d’après nos résultats que sa libération dans les fluides étudiés (le SGF) est moins importante et plus complexe en ce qui concerne le phénomène de cette libération. De toute évidence, la nature structurale de cet agent (macromolécule protéinique) serait à l’origine de ce comportement. Dans ce qui suit, on présente les courbes de libération de l’enzyme avec l’OTC. Cette courbe illustre le phénomène de libération mais pour des raisons de temps nous n’avons pas pu étayer d’une manière plus approfondie cette partie de notre étude.

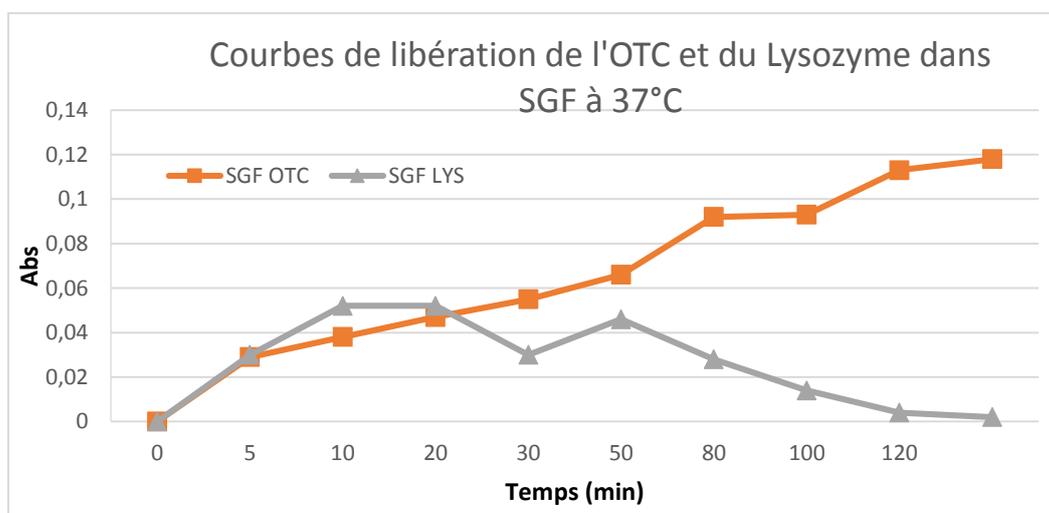


Figure 29: Profils de libération de l’oxytétracycline et du lysozyme dans le SGF, à 37°C.

II.2.7 Préparation et caractérisation microbiologique d'un onguent à base de capsules actives

L'onguent que nous avons préparé conformément à la méthode décrite en II.1.5 sert dans cette étude de base pharmaceutique simple pour des applications dermique comme le montre la figure ci-dessous. Il a été envisagé ici de tester l'utilité et l'activité antibactérienne de cette base formulée avec les microcapsules préparées selon la méthode de la coacervation complexe. Bien évidemment pour des raisons de temps, nous avons uniquement fait des tests de nature microbiologique pour s'assurer de cette efficacité. Ces résultats sont présentés dans le **tableau 12**.

Selon les résultats obtenus, il est clair de voir que l'onguent en tant que préparation de base ne présente pas d'action antibactérienne palpable à l'égard des bactéries testées. Cette observation s'applique aussi dans le cas où il est chargé de capsules vides (ne contenant pas de principe actif). Connaissant le fait que les alginates an tant que polysaccharide ou la gélatine en tant que protéine ne possèdent pas cette action, cette observation attendue.

C'est l'onguent contenant des microcapsules chargées en principe actif (oxytétracycline et/ou lysozyme) qui semble présenter un effet antibactérien non négligeable surtout à l'égard d'*Escherichia Coli* et *Staphylococcus Aureus*. Curieusement, aucune action n'est relevée avec *Staphylococcus Eperdimidis* sachant que l'OTC possède normalement un large spectre d'action sur différentes bactéries (gram⁺ et gram⁻).

Il est très important de suggérer ici une étude plus consistante de l'effet des concentrations de l'agent actif et des phénomènes de libération en relation avec l'efficacité de l'onguent. En effet, des mesures supplémentaires sont recommandées pour optimiser la formulation et donc de l'activité d'une telle préparation à caractère pharmaceutique ou parapharmaceutique qui montre un intérêt certain.

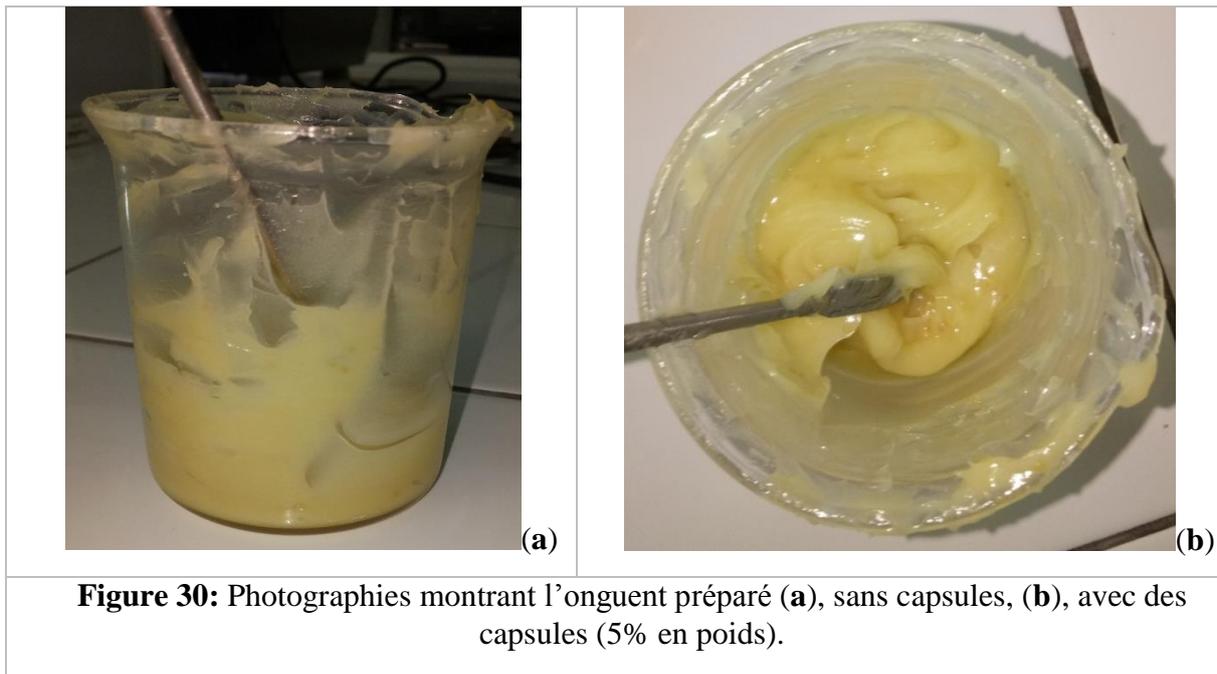


Tableau 12: Tableau montrant les diamètres d'inhibition mesurés selon la méthode des disques avec différentes souches microbiennes sur l'onguent variablement chargé.

Souches Bactériennes	PA (onguent)	Activité	Diamètre d'inhibition	Observation
<i>Escherichia Coli</i>	(blanc)	-	-	Abs. d'inhibition
	+cap vide	-	-	Abs. d'inhibition
	+cap Lys	-	-	Abs. d'inhibition
	+cap OTC	+	16mm	Inhibition
	+cap OTC/ Lys	-	-	Abs. d'inhibition
<i>Staphylococcus A</i>	(blanc)	-	-	Abs. d'inhibition
	+cap vide	-	-	Abs. d'inhibition
	+cap Lys	+	12mm	Inhibition
	+cap OTC	+	12mm	Inhibition
	+cap OTC/ Lys	+	14mm	Inhibition
<i>Staphylococcus Ep</i>	(blanc)	-	-	Abs. d'inhibition
	+cap vide	-	-	Abs. d'inhibition
	+cap Lys	-	-	Abs. d'inhibition
	+cap OTC	-	-	Abs. d'inhibition

CONCLUSION GENERALE

Le travail traité dans cette étude consiste à étudier et à élucider éventuellement la présence d'une synergie dans l'action antibactérienne de l'oxytétracycline et le lysozyme ensemble à l'état encapsulé. Pour concrétiser cet objectif, l'étude a été menée en quatre étapes principales :

Dans la 1^{ère} étape, on s'est occupé à l'extraction et la séparation du lysozyme présent dans le blanc d'œuf de poule d'après la méthode du système à deux phases. Nous avons vérifié l'efficacité de cette extraction avec l'aide d'un dosage des protéines selon la méthode de Bradford. La caractérisation spectroscopique de cet actif biologique (par UV-Vis et infrarouge) a permis d'identifier sa présence sur les bases de données bibliographiques. L'activité antibactérienne du blanc d'œuf et du lysozyme a été mesurée par une méthode de diffusion en puits sur des souches bactériennes standard telles que *Staphylococcus Ep*, *Staphylococcus A.* et *Escherichia C.* Là-dessus, ces tests ont montré que l'effet antibactérien est significatif sur *S. Éperdimidis* et *S. aureus* alors que chez *E. coli*, une résistance au lysozyme a été observée. Cette résistance vis-à-vis du lysozyme résulte du fait que *E. coli* est une bactérie à Gram-.

Dans la suite de notre travail centré principalement sur la préparation de microcapsules à effet thérapeutique, la méthode de coacervation complexe a été choisie car faisant appel à des biopolymères naturels qui sont la gélatine et alginate de sodium. Cette préparation étant maîtrisée, il a été question d'utiliser les microcapsules comme véhicules et vecteurs thérapeutiques pour les deux agents actifs visés dans cette étude, à savoir l'oxytétracycline et le lysozyme. Une caractérisation physico-chimique étendue a été faite sur ces microcapsules par microscopie électronique (MEB), spectroscopie infrarouge (FT-IR) et diffraction des rayons X (DRX).

De taille relativement petite allant de quelques centaines de nanomètres à quelques microns, les particules préparées étaient relativement sphériques et se trouvaient fortement agglutinées à l'état libre, c'est-à-dire non chargées en principe actif. La formation d'un complexe macromoléculaire à base d'alginate et de gélatine était prouvé par FT-IR faisant intervenir le groupe $-COO^-$ du premier et le groupe $-NH_3^+$ du second.

Dans une troisième étape, la préparation des billes d'alginate chargées aux microcapsules elles-mêmes contenant l'oxytétracycline et le lysozyme était envisagée. Les résultats montraient que la préparation de ce système complexe est inhabituel était possible comme le montrait les différentes analyses.

En fin, afin de mieux valoriser les systèmes micro-capsulaires préparés et concrétiser par la même occasion leur application, nous avons préparé un onguent qui est une préparation pharmaceutique de base que nous avons chargé de billes d'alginate contenant les principes actifs utilisés. Les résultats microbiologiques de ce nouveau produit ont démontré que l'effet antibactérien demeure important ce qui prouve que le principe actif arrive à diffuser dans la matière huileuse (onguent). Toutefois, il est recommandé de bien s'approfondir ici en étudiant l'influence des différents facteurs opérationnels rentrant dans la procédure de préparation de cette nouvelle formulation.

1. Composition du Réactif de Bradford

- Bleu de coomassie G250.....50mg
- Ethanol à 95%.....25ml
- Acide Phosphorique(H₃PO₄) à 85%.....50ml
- Eau Distillée.....500ml

NB : conserver à l'abri de la lumière à 4°C.

Composition de la solution mère Stock

- BSA.....100mg
- Eau Distillée.....50ml

2. la courbe d'étalonnage BSA

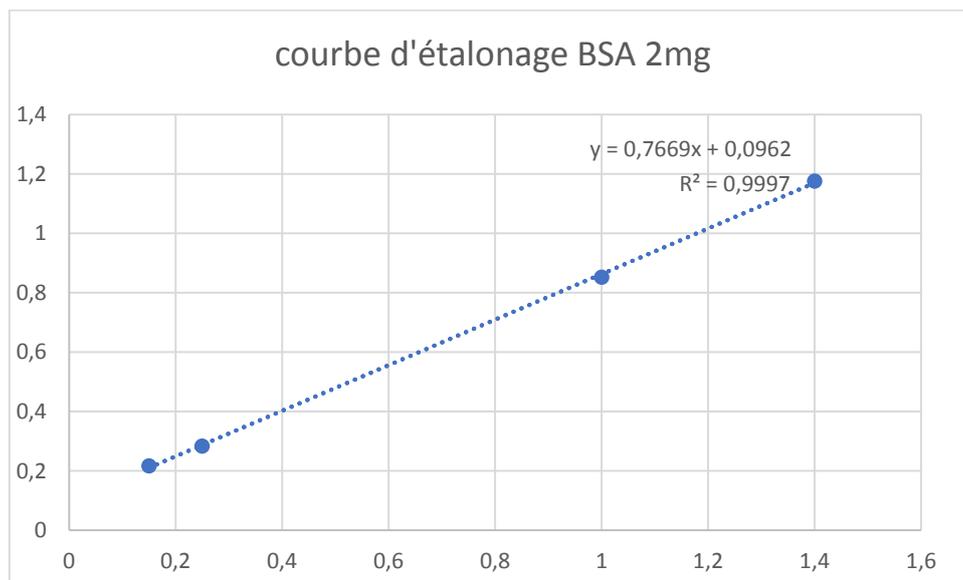


Figure 31: Courbe d'Etalonnage [protéine]=f(Absorbance).

3. Taux d'encapsulation :

(Où la teneur en matière active) peut être très élevée dans les microcapsules, de l'ordre de 85 à 90 % (rapport massique). Comparés à ceux rencontrés dans les microsphères qui sont plus faibles, de l'ordre de 20 à 35 % [12].



Après filtration des microcapsules on a mesuré l'absorbance de filtrat on a trouvé une absorbance de 0.268 et par projection sur la courbe d'étalonnage (voir annexe 1) on trouve une concentration de 0,0077 mg/ml par contre notre concentration initial est de 0.0901 mg/ml.

On cherche maintenant la concentration d'OTC dans les microcapsules :

$$C = C_i - C_s$$

Avec :

C : la concentration d'oxytétracycline encapsulé.

C_i : la concentration d'oxytétracycline initial.

C_s : la concentration d'oxytétracycline non encapsulé.

$$C = 0.0909090909 - 0.007733$$

$$C = 0.0831760909 \text{ mg/ml}$$

Donc : la concentration d'oxytétracycline encapsulé est de 0.0831760909 mg/ml.

Quantité de principe actif encapsulé :

$$m = C \cdot V$$

Avec :

C : concentration d'oxytétracycline encapsulé.

V : le volume total de mélange.

$$m = 0.0831760909 \cdot 220$$

$$m = 18.2987 \text{ mg}$$

• **Le taux d'encapsulation** $EE\% = (m / M) \cdot 100$

Masse initial d'oxytétracycline : M = 20 mg

$$EE\% = (18.2987/20) \cdot 100$$

$$EE\% = 91.49\%$$

Donc on a un taux d'encapsulation de 91.49% donc une quantité de 18.299 mg d'oxytétracycline encapsulé.



4. Les résultats d'analyses par DRX

✓ Analyses DRX d'oxytétracycline :

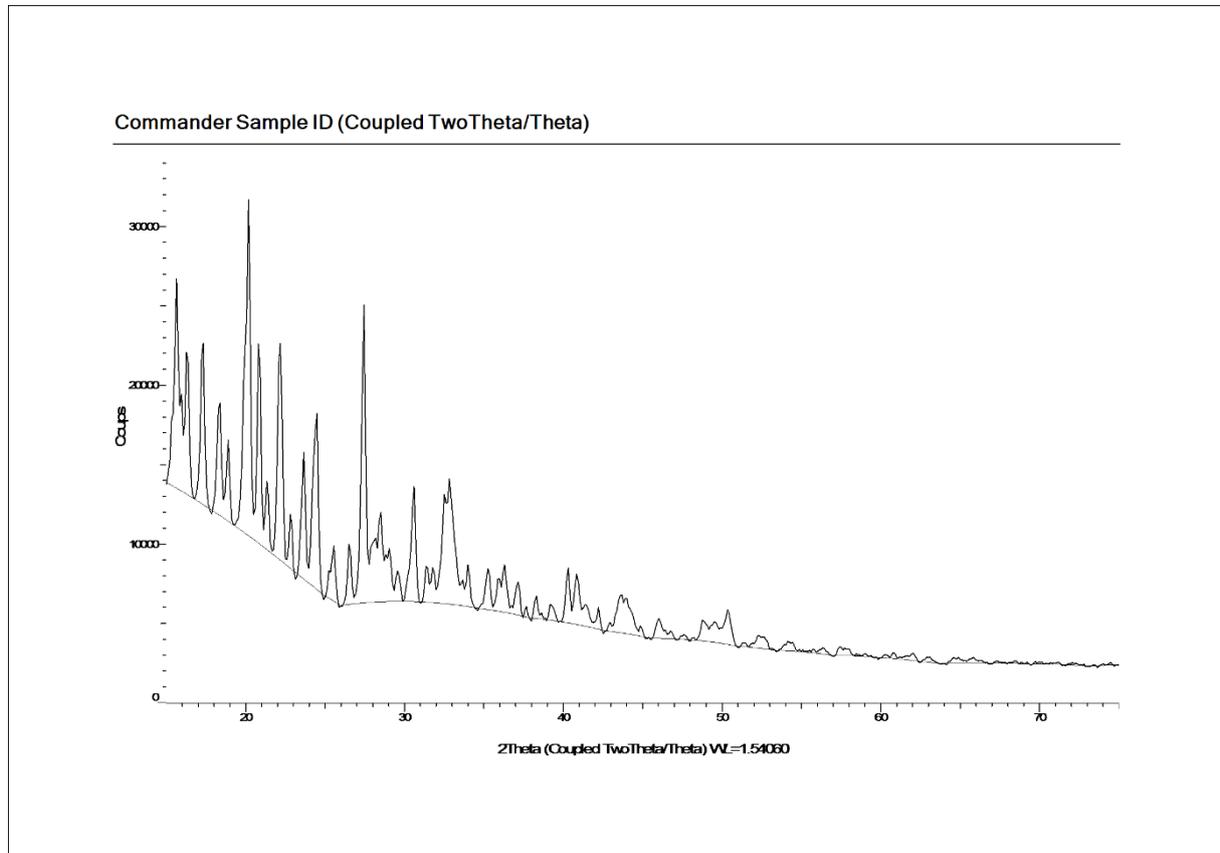


Figure 32 : diffractogramme RX de l'oxytétracycline.

Le diffractogramme de l'OTC montre la présence des pics caractéristiques à ($2\theta = 15.58^\circ$, 16.24° , 17.26° , 18.35° , 20.17° , 20.75° , 22.20° , 23.59° , 24.49° , 27.44° , 30.5° , 32.90°). On se basant sur les données du littérateur [34], de nombreux pics de diffraction aigus ont été détectés, indiquant structure hautement cristalline de l'oxytétracycline.

✓ les microcapsules chargées oxytétracycline :



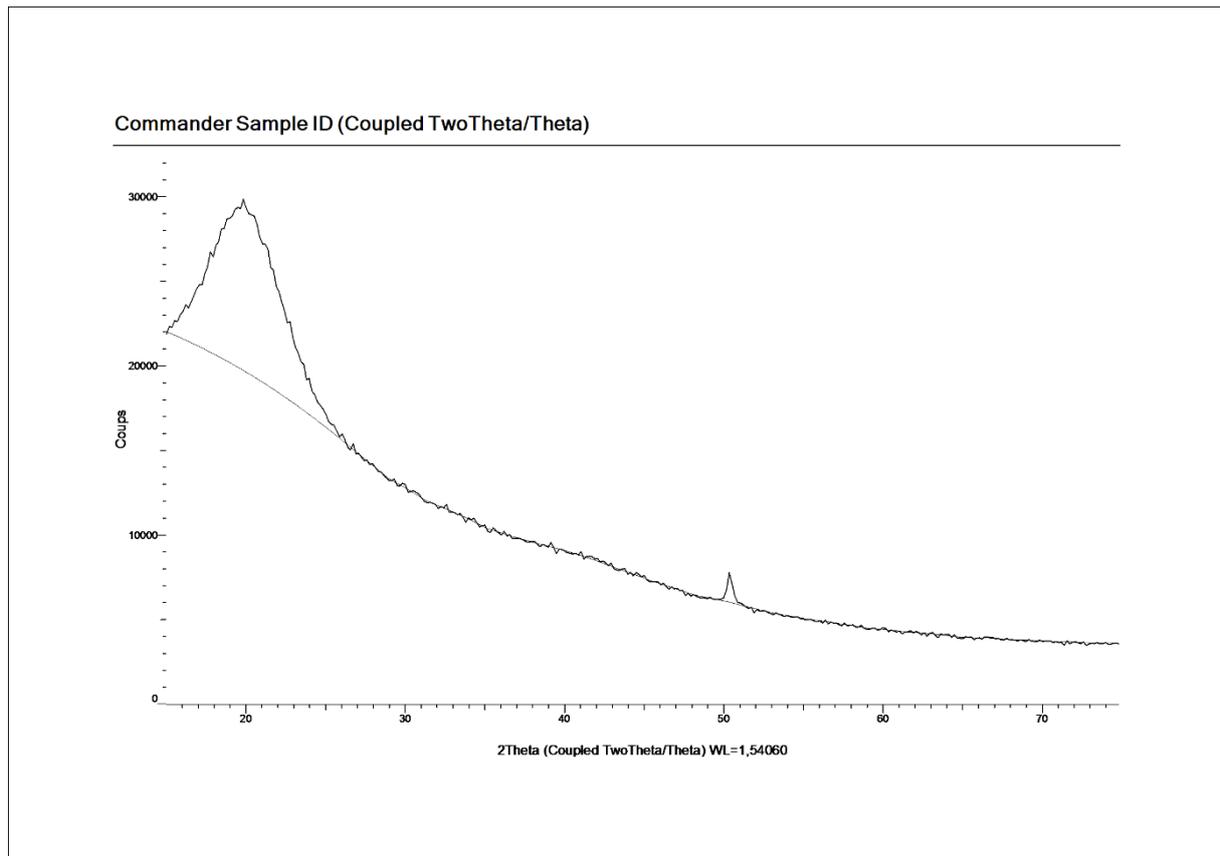


Figure 33 : diffractogramme RX des smart microcapsules chargé oxytétracycline.

On remarque d'après le diffractogramme RX que les smart microcapsules vides ne présentent aucun pic distinct ce qui veut dire que nos capsules sont sous une forme amorphe.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Wan Y., (2012) : Développement de nano vecteurs polymériques et lipidiques fonctionnalisés par des anticorps pour cibler des cellules cancéreuses. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1.
- [2] Couvreur P., (2007) : conception de nouveaux nano-médicaments. La Recherche Sur Le Médicament. Paris.
- [3] N. EKOREZOCK, J. Simon, C. Evrard_Thèse doctorat « Contrôle de qualité de l'oxytétracycline injectable à usage vétérinaire disponible au Mali » Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie université de Bamako, Avril 2006.
- [4] R. Delépée thèse de doctorat Chimie Biologie « Devenir dans l'environnement dulçaquicole de l'oxytétracycline, l'acide oxolinique et la fluméquine, antibiotiques utilisés en thérapeutique piscicole » Université de Nantes, 16 Jan 2009.
- [5] M-J.CAPDEVILLE thèse doctorat « Etudes Des Cycles Biogéochimiques Des Contaminants Organiques Dits « Emergents » Dans Les Systèmes Aquatiques » Université Bordeaux 1, septembre 2011.
- [6] [E. D. N. S. Abeyrathne](#), [H. Y. Lee](#), [D. U. Ahn](#) Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents *Poultry Science*, Volume 92, Issue 12, December 2013, Pages 3292–3299.
- [7] Le chevalier .V. Cisaillement, création d'interfaces et traitement thermique. Thèse de Doctorat de physico-chimie et qualité des bioproduits .Ecole de doctorat vie Agro-Santé (2005).
- [8] Thapon J.L, Bourgeois. J.C. (1994).L'œuf et les ovo produits .In : collection science et techniques agroalimentaires. Edition : technique et documentation, Lavoisier. ISBN : 2852069032. 1-344.
- [9] Huopalahti. R, Lopez – Fandino .R, Anton. M, S chade .R. Bioactive Egg Compounds.ISBN-13:978-3-540-37883-9 .Springer Berlin Heidelberg New York. (2007).
- [10] Ibrahim. H. R, Aoki. T, Pellegrini. A.Stratigies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme and Aprotinin as model molecules. *Current pharmaceutical design*.8 : 671-693., (2002).
- [11] Nau. F, Marc.A, Yves. N. L'œuf de poule : une mine de molécules à activité biologique. Cinquième Journée de la Recherche Avicole, Tours (2003).
- [12] Richard J., Benoit J.P., (2000), Microencapsulation, *Technique de l'Ingénieur*. J 221 p1 –20.
- [13] Boh, B., Sumiga, B., (2008) : Microencapsulation Technology and its applications in building construction materials, *RMZ Materials and Geo environment*, Vol. 55, N°3, 329-344.
- [14] Rama Dubey, T.C. Shami and K.U. Bhasker Rao “Microencapsulation Technology and Applications” *Defence Science Journal*, Vol. 59, No. 1, January 2009, pp. 82-95.



- [15] Giraud S., (2002) : Microencapsulation d'un di-isocyanate et d'un phosphate d'ammonium - Application : élaboration d'un système polyuréthane mono composant à propriété retardatrice de flamme pour l'enduction textile, Thèse de doctorat, Université Lille 1.
- [16] Nesterenko A., (2012) : Étude et fonctionnalisation de protéines végétales en vue de leur application en microencapsulation. Thèse de doctorat, Université de Toulouse.
- [17] [Y. Prasad Timilsena](#) [T. O.Akanbi](#) [N. Khalid](#) [B. Adhikari](#) [C. J.Barrow](#), "Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation" [International Journal of Biological Macromolecules](#), [Volume 121](#), January 2019, Pages 1276-1286.
- [18] Vandamme T., Poncelet D., Subra-Paternault, (2007) : Microencapsulation : des sciences aux technologies, Tech et Doc, Paris.
- [19] Finch C.A, Bodmeier R.: (2000): Microencapsulation, in: Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Electronic Release, 6th ed, Wiley-VCH, Weinheim 7.
- [20] Bernard F.G., Selim K., Inteaz A., et al, (1999): Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 50, 213-217.
- [21] Madene A., Jacquot M., Scher J., Desorby S., (2006): Flavour encapsulation and controlled release – a review, *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 41,1 – 21.
- [22] Poncelet D., (2006) "Microencapsulation: Fundamentals, methods and applications", *Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science*, pp.23-34.
- [23] GUERY J., 2006, Emulsions doubles cristallisables : stabilité, encapsulation et relargage, Docteur en physique (Spécialité : Sciences des Matériaux), Université du Paris VI, Laboratoire de Liquides Ioniques et Interfaces Chargées à Paris, P38.
- [24] XIAOLING L.I., BHASKARA R.J., 2006, Design of Controlled Release Drug Delivery Systems, Mc GRAW-HILL, New York, P 115-120, 146-149, 206,281.
- [25] IGOR G., MATTIASSON B.O., 2008, Smart polymers Applications in Biotechnology and Biomedicine, CRC Press, New York, 2^{ème} édition, p 148-150 ET 166ET 419.
- [26] Delcea, M., Möhwald, H., & Skirtach, A. G. (2011). Stimuli-responsive LbL capsules and nanoshells for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(9), 730–747.
- [27] Yong Y.H., Yamaguchi S. and Matsumura Y, (2006): Effects of enzymatic deamidation by proteinglutaminase on structure and functional properties of wheat gluten. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6034-6040.
- [28] Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system Chia-Kai Su a, Been Huang Chiang b,*a Department of Leisure, Recreation, and Tourism Management, Southern Taiwan University of Technology, *Process Biochemistry* 41 (2006) 257–263.
- [29] Bradford Protein Assay [Fanglian He](#) DOI: [10.21769/BioProtoc.45](#) Published March 20, 2011 [Biochemistry](#) > [Protein](#) > [Quantification](#).
- [30] Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex



- Nirmala Devi, Dilip Kumar Kakati Department of Chemistry, Gauhati University, Guwahati 781 014, India Journal of Food Engineering.
- [31] Spontaneous and efficient adsorption of lysozyme from aqueous solutions by naturally polyanion gel beads by Jiwei Li, Yang Si, Cunyi Zhao, Jinmei He, Gang Sun, Yudong Huang DOI: doi: 10.1016/j.msec.2017.03.092.
- [32] Henri PAQUETON, Jacky RUSTE technique de l'ingénieur, technique d'analyse, Microscopie électronique à balayage - Principe et équipement P865 v2.
- [33] S. Teychené thèse doctorale : « Génie des Procédés et de l'environnement par Maîtrise du Polymorphisme dans les Procédés de Cristallisation de Produits d'Intérêts Pharmaceutiques : Application à La Cristallisation de l'Eflucimibe » 2004.
- [34] Jong-Cheol Jeong, Jaeyoung Lee, Kilwon Cho "Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly (ε-caprolactone) microspheres Journal of Controlled Release 92 (2003) 249– 258.
- [35] M.N. Freitas, J.M. Marchetti "Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases" International Journal of Pharmaceutics 295 (2005) 201–211.
- [36] Kalaiyarasan Thiyagarajan, Vijay K. Bharti, Shruti Tyagi, Pankaj K. Tyagi, Anami Ahuja, Krishna Kumar, Tilak Raja and Bhuvnesh Kumar. Synthesis of non-toxic, biocompatible, and colloidal stable silver nanoparticle using egg-white protein as capping and reducing agents for sustainable antibacterial application. RSC Adv., 2018, 8, 23213.
- [37] Chong-qiu Jiang and Ting Wang. Study of the interactions between tetracycline analogues and lysozyme. Bioorganic & Medicinal Chemistry 12 (2004) 2043–2047.
- [38] Mitscher, L.A. (1978) The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics. Medicinal Research Series Volume 9, Marcel Dekker, Inc. New York, NY. 330 p.

