

République Algérienne Démocratique Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة ابن خلدون - تيارت
Université Ibn Khaldoun – Tiaret



Faculté des Sciences de la Matière
كلية علوم المادة
Département de Chimie
قسم الكيمياء

Mémoire

Présenté par :

M^{elle}. Nasri Ahlam
M^{elle}. Larachi Asma

Pour obtenir le diplôme de

Master

Filière : Chimie
Spécialité : Chimie Organique

Sujet :

**Combinaison, caractérisation, encapsulation et étude
biologiques des agents actifs**

Soutenu le : 29/06/2025

Devant le jury :

M^r. DEBDAB Mansour	Président	Pr à UNIV -Tiaret
M^{lle}. HENNI Meriem	Examinatrice	MCA à UNIV -Tiaret
M^{me}. ABDELMALEK Ilham	Promotrice	MCA à UNIV -Tiaret
M^{lle}. BOUTHELDJA Rachida	Co-promotrice	MCB à UNIV -Tiaret

Année universitaire : 2024/2025

Remerciement

La réalisation de ce mémoire a été rendue possible, par la grâce d'Allah en premier lieu, puis grâce au concours de plusieurs personnes à qui je souhaite exprimer toute ma gratitude.

Nous tenons tout d'abord à adresser notre profonde reconnaissance à Madame **ABDELMALEK Ilham**, directrice de ce mémoire, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses conseils avisés, qui ont largement contribué à nourrir notre réflexion et à orienter notre travail.

Nous remercions également **Mademoiselle Boutheldja Rachida** pour sa patience et pour avoir pris le temps de répondre à nos nombreuses questions.

Nos sincères remerciements vont également aux membres du jury, **Professeur DEBDAB Mansour**, et **Madame HENNI Meriem MCA**, de la Faculté des Sciences des Matériaux de Tiaret, d'avoir accepté d'évaluer notre travail.

Nous remercions chaleureusement l'ensemble des laborantins du laboratoire de chimie : **Monsieur LARBI Abdelkader**, **Madame BEBOU Fatiha**, **Madame KOUADRIA Soumia** et **Mademoiselle SAHNOUN Nadia**, pour leur assistance et leur soutien technique tout au long de notre travaux.

Nos remerciements s'adressent également aux techniciens du laboratoire de l'Institut Vétérinaire de l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret : **Monsieur DOUCENE Radouane** et **Madame Benhemouda Soheir Lila**, qui nous ont fourni les outils et les moyens nécessaires à la réussite de mes recherches.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à l'ensemble de nos enseignants pour la qualité de leur enseignement, leur disponibilité et leur accompagnement tout au long de notre formation. Leur savoir, leur rigueur et leur engagement ont largement contribué à notre parcours académique et à l'élargissement de nos connaissances.

Nous remercions également nos collègues et camarades de promotion pour leur esprit de collaboration, leur entraide et les nombreux moments de partage vécus ensemble. Leur soutien moral et leur convivialité ont rendu cette expérience universitaire plus enrichissante

Dédicace

À

Mes parents, pour leur amour, leur soutien inconditionnel et leurs encouragements constants tout au long de mes années d'études. Leur présence et leur confiance ont joué un rôle essentiel dans ma réussite.

À

Ma sœur, à mes grands-parents et à tous ceux qui ont partagé avec moi les joies et les défis de ce parcours. Leur soutien moral a été précieux à chaque étape.

À

Mes frères et sœurs, pour leur affection et leur présence bienveillante.

À

Mes amies, qui sont devenues une seconde famille et dont l'amitié fidèle a été une source de force et de réconfort.

À

Toute ma famille et à toutes les personnes chères à mon cœur.

Asma

À

Mes parents, qui m'ont toujours encouragée et soutenue dans mes études, et dont l'amour et la bienveillance ont été une source constante de motivation.

À

Mes sœurs et mes frères, pour leur affection, leur accompagnement et leur présence tout au long de ce parcours.

À

Mes amies, ma seconde famille, pour leur amitié sincère, leur fidélité et les précieux moments partagés.

Ahlam

ملخص

تتناول هذه الدراسة تكوين مركبات فوق جزيئية بين الأموكسيسيلين وثلاثة مكونات دوائية فعالة هي الأمبيسيلين، وحمض النيفلوميك، والكلورامفينيكول. أكدت تحاليل الأشعة فوق البنفسجية، تحويل فورييه للأشعة تحت الحمراء و مطيافية الأشعة السينية وجود تفاعلات بين هذه الجزيئات. تم تحضير ميكروسفيرات من نظامين أظهرت كفاءة عالية في التغليف، مع إطلاق يتحكم فيه الانتشار. كشفت الاختبارات البيولوجية عن نشاطات مضادة للبكتيريا، ومضادة للأكسدة، ومضادة للالتهابات متفاوتة. أظهر المركب تأثيرًا معاكسًا. كما أظهرت المركبات فوق الجزيئية قدرة S3 و S2 تأثيرًا تعاونيًا ضد الإشريكية القولونية، بينما أظهر المركبان S1 مضادة للأكسدة متوسطة مقارنة بالمضادات القياسية. تؤكد البنية غير المتبلورة للميكروسفيرات نجاح عملية التغليف. وتبرز هذه النتائج الأهمية الدوائية للمركبات فوق الجزيئية في تحسين نظم إيصال الأدوية.

Résumé

Cette étude a exploré la formation de supramolécules entre l'amoxicilline et trois principes actifs (ampicilline, acide niflumique, chloramphénicol). Les caractérisations UV-Visible, FTIR et DRX ont confirmé des interactions intermoléculaires spécifiques. Des microsphères ont été élaborées à partir de deux systèmes, avec une encapsulation efficace et une libération régie par diffusion. Les tests biologiques ont révélé des activités antibactériennes, antioxydantes et anti-inflammatoires variables. S1 a montré un effet synergique contre *E. coli*, tandis que S2 et S3 présentent des effets antagonistes. L'activité antioxydante des supramolécules reste modérée comparée aux standards. La structure amorphe des microsphères confirme une encapsulation réussie. Ce travail souligne l'intérêt pharmaceutique des assemblages supramoléculaires dans l'optimisation des formulations.

Abstract

This study investigated the formation of supramolecular complexes between amoxicillin and three active pharmaceutical ingredients (ampicillin, niflumic acid, and chloramphenicol). UV-Visible, FTIR, and XRD analyses confirmed specific intermolecular interactions. Microspheres were prepared from two systems, showing efficient encapsulation and a release profile governed by diffusion. Biological tests revealed variable antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory activities. S1 exhibited a synergistic effect against *E. coli*, while S2 and S3 showed antagonistic behavior. The supramolecules displayed moderate antioxidant activity compared to standard agents. The amorphous structure of the microspheres confirmed successful encapsulation. These findings highlight the pharmaceutical potential of supramolecular assemblies in optimizing drug delivery systems.

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Différentes techniques utilisées pour la microencapsulation	07
Tableau II.1 : Les compositions des supramolécules	18
Tableau II.2 : Les compositions des microsphères	19
Tableau III.1 : Résultats des tests de solubilité	33
Tableau III.2 : Les bandes caractéristiques des principes actifs étudiés	33
Tableau III.3 : Les pics caractéristiques en DRX des principes actifs étudiés	37
Tableau III.4 : Taux d'encapsulation et distribution des tailles	40
Tableau III.5 : Résultats granulométriques des microsphères Amoxicilline	41
Tableau III.6 : Les constantes de vitesse selon la loi d'Higuchi et les coefficients de corrélation pour les deux microsphères	49
Tableau III.7 : Les calculs des concentrations inhibitrices médianes	54

Liste des figures

Figure I.1 : Représentation de certaines nanostructures supramoléculaires.	03
Figure I.2 : Différents types de microparticules.	07
Figure I.3 : Encapsulation par évaporation de solvant.	08
Figure II.1 : Structure Chimique de l'amoxicilline.	16
Figure II.2 : Structure Chimique de l'ampicilline.	17
Figure II.3 : Structure Chimique de l'acide niflumique.	17
Figure II.4 : Structure Chimique de chloramphénicol.	17
Figure II.5 : La micro-onde utilisée pendant la préparation des supramolécules.....	19
Figure II.6 : Le montage utilisé dans la préparation des microsphères.....	20
Figure II.7 : Dispositif expérimental de la libération du principe actif.	23
Figure II.8 : Le spectre d'absorption d'amoxicilline dans le milieu pH=1.2.	23
Figure II.9 : La courbe d'étalonnage d'amoxicilline.	24
Figure II.10 : Préparation de milieu de culture.	25
Figure II.11 : Le milieu stérile dans les boîtes de pétri.....	26
Figure II.12 : Coloration en gramme.	26
Figure II.13 : Analyse par microscope.....	27
Figure II.14 : Le repiquage dans les milieux sélectifs.....	27
Figure II.15 : Les disques des agents actifs dans les boites de pétri.....	28
Figure III.1 : Spectre d'absorption d'amoxicilline.	30
Figure III.2 : Spectre d'absorption de l'acide niflumique.	31
Figure III.3 : Spectre d'absorption de S1.	32
Figure III.4 : Spectre d'absorption de S2.	32
Figure III.5 : Spectre FTIR d'amoxicilline.	33
Figure III.6 : Spectre FTIR de supramolécule S1 (amo+amp) et mélange physique.....	35
Figure III.7 : spectre FTIR de S2 (AMO+AN) et le mélange physique.	36
Figure III.8 : Spectres FTIR S3 (AMO+chloramphénicol) et le mélange physique.	36
Figure III.9 : Le diffractogramme d'amoxicilline.	37
Figure III.10 : Diffractogramme de mélange physique (AMO+AMP) et de S1.	38
Figure III.11 : Diffractogramme de mélange physique (AMO+AN) et de S2.	39
Figure III.12 : Diffractogramme de mélange physique (AMO+CA) et de S3.	39
Figure III.13 : Courbes de distribution des tailles de MS1.	41
Figure III.14 : Images MEB des MS1 et MS2.	42

Figure III.15 : Spectres FTIR de microsphère MS1.	43
Figure III.16 : Spectre FTIR des microsphères MS2.	44
Figure III.17 : Les diffractogrammes d'AMO, EC et MS1.....	44
Figure III.18 : Les diffractogrammes du S1, EC et MS2.	45
Figure III.19 : Pourcentage d'AMO libéré en fonction du temps à partir des microsphères dans un PH =1,2 et T= 37°C.	46
Figure III.20 : Pourcentage d'AMO et AMP libéré en fonction du temps à partir des microsphères dans un PH =1,2 et T= 37°C.	46
Figure III.21 : Le pourcentage libéré en fonction du temps (ordre 0) pour MS2.....	47
Figure III.22 : Ln [(m ₀ -m _t) /m ₀] en fonction du temps (ordre 1) pour MS2.	47
Figure III.23 : (1/m ₀ -m _t) / (1/m ₀) en fonction du temps (ordre 2) pour MS2.	48
Figure III.24 : Pourcentage libéré en fonction de la racine carrée du temps pour MS1....	48
Figure III.25 : Le pourcentage libéré en fonction de la racine carrée du temps à partir des MS2.....	49
Figure III.26 : Résultats de l'inhibition de la souche <i>Staphylococcus</i> par CA et S3.	50
Figure III.27 : Résultats de l'inhibition de la souche <i>E. Coli</i> par AMO, CA et S3.	50
Figure III.28 : Représentation des diamètres d'inhibition des tests bactériologiques.	51
Figure III.29 : Représentation des diamètres d'inhibition des tests bactériologiques.	51
Figure III.30 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA) par les différents composés.	52
Figure III.31 : Les résultat de test antioxydant sur les principes actifs.	53
Figure III.32 : Les résultats de test antioxydant sur les supramolécules.	53
Figure III.33 : Le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de S1	54
Figure III.34 : Les probabilités structurales de S1.	56
Figure III.35 : Les probabilités structurales de S2.....	56
Figure III.36 : Les probabilités structurales de S3.	56

Liste des abréviations et symboles

Abs : Absorbance.

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

AC : Absorbance du contrôle (Abs de solution blanc)

AMO : Amoxicilline

AMP : Ampicilline.

AN : Acide niflumique.

AT : 2-amino-4-(4-chlorophényl) –thiazole.

AT : Absorbance des tests effectués. (Abs des solutions préparé).

AuNP : Nanoparticules d'or.

BHT : Butylhydroxytoluène.

BSA : Albumine sérique bovine.

C : Concentration molaire.

CA : Chloramphénicol.

CAP : Acétate-phtalate de cellulose.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CFX : Céfixime.

CI50 : Concentration inhibitrice médiane.

CNT : Nanotubes de carbone.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DRX : Diffusion des rayons X

DO : Densité optique.

DOX : Doxorubicine.

DPPH : (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle).

d₁₀ : Le diamètre moyen en nombre.

d₃₂ : Le diamètre moyen en surface.

d₄₃ : Le diamètre moyen en masse.

di : Centre de classe.

EC : Ethyle cellulose.

E. coli : Escherichia coli.

EMeOH : Extrait méthanolique.

Fe : Fer.

FTIR : Infrarouge à transformée de Fourier.

GN : Gélose nutritive.

HA : Acide hyaluronique.

HE : Huiles essentielles.

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance.

i : La classe des particules.

I : La longueur de la cellule en quartz.

ICG : Le vert d'indocyanine.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice 50%.

I% : Pourcentage d'inhibition.

K_H : Constante de vitesse selon la loi d'Higuchi.

Ln : Log népérien.

M : Masse molaire du PA.

MCF-7 : Cellulaire de cancer du sein humain.

MEB : Microscopie électroniques à balayage.

mg EAG/g : Milligramme d'équivalent acide gallique par gramme.

mg EQ/g : Milligramme d'équivalent de quercétine par gramme

mi : Masse initiale de PA.

MS : Microsphère.

m_t : La masse du principe actif libérée.

MWNT : Nanotubes de carbone à plusieurs parois.

Ni : Nombre de particules de la classe.

NIR : Lumière proche infrarouge.

PA : Principe actif.

Pa : Le pourcentage du PA libéré.

PBS : Poly (butylsuccinate).

pH : Potentiel Hydrogène.

PhEA : Phényl-éthylamine.

PLP : Protéines liant la pénicilline.

PVA : Polyvinyle alcool.

Q : Quantité de matière libéré.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

Rdt : Rendement.

R² : Coefficient de corrélation.

S. aureus : Staphylococcus aureus.

SM : Solution mère

SWNT : Nanotubes de carbone à paroi unique.

S : Supramolécule.

t^{1/2} : Racine de t

UV : Ultra-violet.

UV-Vis : Ultra-violet-Visible.

Vp: Volume du prélèvement.

Vf : Volume de la solution après dilution.

VF : Volume de la solution restante dans le flacon après chaque prélèvement.

βCD : β-cyclodextrine.

ε : Coefficient d'extinction molaire.

λ : Longueur d'onde.

μm : Micromètre.

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

SOMMAIRE

Introduction générale 01

Références introduction générale

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Introduction 03

I.2. Définitions des supramolécules 03

I.3. Etat de l'art des supramolécules..... 04

I.4. La microencapsulation 06

- I.4.1. Définition de la microencapsulation..... 06

- I.4.2. Classification des microparticules..... 06

- I.4.3. Techniques de microencapsulation..... 07

- I.4.4. Encapsulation par évaporation de solvant..... 08

I.5. Approches actuelles de la microencapsulation..... 08

I.6. L'état de l'art des activités biologique 10

- I.6.1. Activités antioxydant..... 10

- I.6.2. Activités antibactériennes..... 12

- I.6.3. Activités anti-inflammatoires..... 14

Références rappels bibliographiques

PARTIE EXPÉRIMENTALE

II.1. Introduction 16

II.2. Produits utilisés 16

II.3. Préparation des supramolécules..... 18

II.4. Préparation des microsphères..... 19

II.5. Techniques de caractérisation.....20

II.6. Cinétique de libération.....	22
• II.6.1. Préparation des milieux reconstitués.....	22
• II.6.2. Etude cinétique de la libération.....	22
II.7. Test biologique.....	25
• II.7.1. Test antibiotique.....	25
• II.7.2. Test anti inflammatoire.....	28
• II.7.3. Test antioxydant.....	29
Références partie expérimentale	
RESULTATS ET DISCUSSIONS	
III.1. Introduction.....	30
III.2. Caractérisation des supramolécules.....	30
• III.2.1. Caractérisation UV-Visible.....	30
• III.2.2. Test de solubilité.....	32
• III.2.3. Spectre FTIR.....	33
• III.2.4. Spectre DRX.....	37
III.3. Caractérisation des microsphères.....	40
• III.3.1. Taux d'encapsulation et distribution des tailles.....	40
• III.3.2. Caractérisation par MEB.....	41
• III.3.3. Caractérisation par FTIR.....	42
• III.3.4. Caractérisation par DRX.....	44
III.4. Etude cinétique.....	45
III.5. Résultats des tests biologiques.....	50
• III.5.1. Test antibiotique.....	50
• III.5.2. Test anti-inflammatoire.....	52
• III.5.3. Test antioxydant.....	53
III.6. Conclusion.....	58
Références résultats et discussions	

Conclusion générale

Annexe

Introduction générale

La chimie pharmaceutique est une discipline interdisciplinaire qui s'intéresse à la conception, la synthèse, l'analyse et l'optimisation des molécules actives. Elle étudie notamment leurs propriétés physico-chimiques, leurs interactions moléculaires, ainsi que leur comportement *in vivo* et *in vitro* [1,2]. Cette discipline vise à optimiser l'efficacité thérapeutique des médicaments, à réduire leurs effets indésirables et à concevoir de nouvelles entités thérapeutiques.

La combinaison de plusieurs principes actifs représente une stratégie thérapeutique courante pour améliorer la prise en charge de maladies complexes, en ciblant plusieurs mécanismes d'action simultanément. Cette approche permet souvent de produire des effets synergiques, c'est-à-dire un effet global supérieur à la somme des effets individuels [3,4]. Parallèlement, les excipients, bien que considérés comme inertes, jouent un rôle essentiel dans la stabilité, la solubilité et la biodisponibilité des médicaments. Leur interaction avec les principes actifs est également étudiée en chimie pharmaceutique pour optimiser la formulation galénique [5].

Dans cette étude, nous avons exploré la formation de complexes supramoléculaires à partir d'antibiotiques et d'un anti-inflammatoire non stéroïdien, afin d'améliorer les performances thérapeutiques des principes actifs par interactions non covalentes. La chimie supramoléculaire, introduite par Jean-Marie Lehn [6], repose sur l'auto-assemblage de molécules via des liaisons faibles (liaisons hydrogène, interactions π - π , etc.). Cette stratégie permet d'obtenir de nouvelles entités fonctionnelles sans modification covalente.

Dans ce cadre, nous avons combiné l'amoxicilline, une aminopénicilline de large spectre, séparément avec l'ampicilline, le chloramphénicol, et l'acide niflumique, un AINS, afin de générer des structures supramoléculaires sous irradiation micro-ondes, une méthode efficace, rapide et respectueuse de l'environnement pour favoriser les interactions intermoléculaires [7,8].

Les complexes obtenus ont été caractérisés par spectroscopie UV-Visible, spectroscopie infrarouge (FTIR), diffraction des rayons X (DRX). Par la suite, des tests biologiques *in vitro* ont été réalisés pour évaluer les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes des composés [9]. Ces tests permettent d'examiner le potentiel pharmacologique des formulations étudiées.

Dans une seconde phase, nous avons appliqué la technique de microencapsulation par évaporation de solvant [10], dans le but de protéger les principes actifs et de contrôler leur libération. Cette technique, largement utilisée en pharmaceutique, permet de stabiliser les

molécules sensibles et d'améliorer leur biodisponibilité. Deux systèmes ont été encapsulés : l'amoxicilline seule et la supramolécule amoxicilline–ampicilline. Les microparticules obtenues ont été analysées par : FTIR, DRX, microscopie électronique à balayage (MEB), et microscopie optique. Des études biologiques similaires à celles des formes libres ont été menées sur ces formes encapsulées afin de comparer leurs propriétés thérapeutiques.

Ce travail est structuré en trois chapitres :

- **Chapitre I** – Revue bibliographique : Présentation des concepts fondamentaux relatifs aux supramolécules, à la microencapsulation, et à l'état de l'art concernant les activités biologiques associées aux principes actifs étudiés.
- **Chapitre II** – Méthodologie expérimentale : Description des protocoles de préparation des complexes supramoléculaires, de microencapsulation, des techniques de caractérisation, de la cinétique de libération, et des tests biologiques appliqués.
- **Chapitre III** – Résultats et discussions : Analyse et interprétation des résultats expérimentaux obtenus, avec mise en relation avec les données de la littérature.

Le mémoire se conclut par une conclusion générale, résumant les contributions de l'étude et proposant des perspectives de recherche futures.

Références introduction générale

1. Patrick GL. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 7th ed. Oxford University Press; 2023.
2. Silverman RB, Holladay MW. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*. 3rd ed. Academic Press; 2014.
3. Tallarida RJ. Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;298(3):865–72.
4. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):621–81.
5. Aulton ME, Taylor K. *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*. 5th ed. Elsevier; 2018.
6. Lehn JM. Supramolecular Chemistry – Scope and Perspectives. Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1988;27(1):89–112.
7. Kappe CO. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2004;43(46):6250–85.
8. Lidström P, Tierney J, Wathey B, Westman J. Microwave assisted organic synthesis – a review. *Tetrahedron*. 2001;57(45):9225–83.
9. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181:1199–1200.
10. Benita S. *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*. 2nd ed. CRC Press; 2005.



CHAPITRE I :

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.1. INTRODUCTION

Face à la demande croissante dans ce monde, les chimistes ont été incités à élaborer de nouveaux composés en fusionnant diverses structures pour donner naissance à un nouveau type de composé appelé supramolécules. Ce dernier possède des propriétés inédites qui répondent aux besoins tels que la capacité de dissolution, la durabilité et l'efficacité. Ces supramolécules présentent dans de nombreux domaines tel que la chimie pharmaceutique comme transporteur des médicaments ou bien comme agent actif...etc. Les supramolécules utilisés comme agent actif nécessitent des formes galéniques à libération contrôlée comme les microsphères qui sont considéré comme un type de microencapsulation [1].

I.2. DEFINITIONS DES SUPRAMOLECULES

Les supramolécules sont des molécules résultant par la combinaison d'éléments moléculaires à partir des liaisons non covalentes, telles que les forces de van der Waals, les liaisons hydrogène, l'interaction d'empilement π - π , les interactions électrostatiques ou les interactions hydrophobes/hydrophiles [2]. L'objectif de développement de ces produits est d'améliorer leurs propriétés afin de les utiliser dans plusieurs domaines en tant que matériaux fonctionnels, dans les processus catalytiques, les dispositifs électroniques, les capteurs ou les vecteurs de médicaments et la nanomédecine etc [2]. Plusieurs nanostructures supramoléculaires sont créées à partir des différentes forces qui assurent l'association des unités de construction tel que le nanotube et les micelles issues des liaisons hydrophobes/hydrophiles ...etc [3].

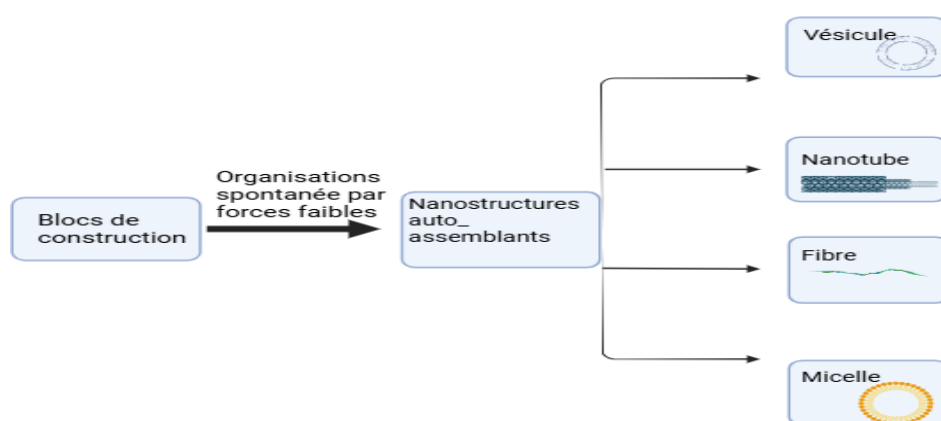


Figure I.1: Représentation de certaines nanostructures supramoléculaires.

I.3. ETAT DE L'ART DES SUPRAMOLECULES

Dans le domaine de la recherche sur les composés supramoléculaires, certains chercheurs ont étudié, sur les plans structural et thermodynamique, les complexes hôte-invité formés entre un macrocycle cationique, le « pillar-5-arène », et des composés amphiphiles chargés, les alkylsulfonates. Ces derniers conservent un groupe tête constant, tandis que leur hydrophobicité est modulée par la variation de la longueur de la chaîne hydrocarbonée. Grâce à des études fondamentales menées par RMN du proton et par microcalorimétrie, l'interaction entre ces récepteurs de type pillar-5-arène et les amphiphiles est approfondie dans la perspective d'applications pharmaceutiques potentielles, telles que les vecteurs de médicaments, les canaux transmembranaires ou les colles cellulaires, impliquant ces macrocycles [2]. La β -cyclodextrine (β CD) est un oligosaccharide cyclique qui possède une cavité hydrophobe et une surface extérieure hydrophile, la β CD a été largement utilisée comme molécule hôte pour la conception de systèmes de transport de médicaments sous diverses formes, telles que des vésicules, des hydrogels, des micelles, des systèmes organométalliques et des nanoparticules [4]. Dans les recherches modernes sur la délivrance de médicaments, la nanosponge à base de β -cyclodextrine (β CDNS) constitue une modification structurelle du β CD natif, obtenue par la synthèse d'un réseau polymère réticulé formant une matrice hautement poreuse et ramifiée à l'échelle nanométrique. Cette modification améliore à la fois la capacité d'inclusion de biomolécules invitées de plus grande taille et la solubilité de la β CD. Des chercheurs proposent ainsi le développement d'un nouveau système de transport basé sur les β CDNS pour la co-délivrance de deux agents thérapeutiques : la phényl-éthylamine (PhEA) et le 2-amino-4-(4-chlorophényl) -thiazole (AT) [4]. Dans ce travail, l'inclusion de (PhEA) et du (AT) a été confirmée par différentes méthodes de caractérisation. Les complexes supramoléculaires β CDNS-médicament ont été ensuite fonctionnalisés à l'aide de nanoparticules d'or (AuNPs), formant les systèmes β CDNS-PhEA-AuNP et β CDNS-AT-AuNP. Les résultats de ces recherches montrent que la capacité d'inclusion des β CDNS atteint 90 % pour la PhEA et 150 % pour l'AT, soit une efficacité jusqu'à huit fois supérieure à celle obtenue avec la β CD native. Une amélioration significative de la solubilité aqueuse des deux composés a également été observée lorsqu'ils sont complexés avec les β CDNS, conduisant à une solubilisation et une efficacité de complexation nettement accrues par rapport aux complexes formés avec la β CD non modifiée.

Hormis le pouvoir d'inclusion, les maladies mortelles sollicitent l'usage de supramolécules comme dans le cas du cancer qui constitue une menace sérieuse pour la santé

humaine. C'est la raison pour laquelle quelques chercheurs se sont attelés à l'élaboration d'une thérapie contre le cancer, alliant la photothérapie, les traitements médicamenteux et les nanomatériaux destinés à l'administration de médicaments anticancéreux et à l'utilisation d'agents diagnostiques [5]. Parmi l'ensemble des nanomatériaux, les nanotubes de carbone (CNTs) offrent de nombreuses opportunités d'application en matière de théranostique du cancer. Les CNT contiennent de petites structures tubulaires constituées d'atomes de carbone agencés pour former une nanostructure en forme de nid d'abeille. On peut les catégoriser en nanotubes de carbone à paroi unique (SWNT) ou en nanotubes de carbone à plusieurs parois (MWNT), en fonction du nombre de couches d'atomes de carbone, les deux ayant une importance notable dans le traitement du cancer.

La photothérapie est une modalité thérapeutique émergente qui tire parti de l'énergie laser pour éliminer la tumeur cible en raison de sa haute sélectivité. La lumière NIR est toujours utilisée comme source lumineuse pour la photothérapie. Le vert d'indocyanine (ICG) est un colorant NIR utilisé en photothérapie en raison de sa forte absorption de la lumière dans la fenêtre NIR. Sa mauvaise solubilité, son instabilité, son agrégation dépendante de la concentration et son élimination rapide entravent largement l'efficacité de l'ICG en photothérapie. Dans le but de surmonter ces inconvénients, la construction d'un transporteur de médicament approprié pour charger l'ICG est d'une grande nécessité.

Basant sur la notion supramolécule, Tang et al ont réussi à faire une chimio photothérapie synergique en adoptant les MWNT pour transporter l'agent photo thermique ICG-NH₂ et le médicament anticancéreux doxorubicine (DOX). Ce traitement a été testé sur le cellulaire humaine du cancer du sein MCF-7. Dans cette combinaison, l'ICG-NH₂ a été conjugué avec de l'acide hyaluronique (HA) pour former le conjugué HA-ICG, ce qui a amélioré la solubilité dans l'eau de l'ICG-NH₂. Ensuite, le MWNT-HA-ICG a été synthétisé, ce qui a considérablement amélioré la performance photothermique par rapport au MWNT ou à l'ICG-NH₂ seuls. De plus, la connexion via HA pouvait conférer à l'ensemble du système de délivrance de médicaments une bonne dispersibilité et biocompatibilité (avec les récepteurs CD44). Pour réaliser une thérapie chimio-photo-thermique synergique, la DOX a été attachée à la surface des MWNT afin d'obtenir les nano-complexes finaux (MWNT-HA-ICG/DOX). La délivrance ciblée de DOX via MWNT-HA-ICG a considérablement amélioré l'efficacité thérapeutique de DOX par rapport à une administration libre, tout en réduisant les effets secondaires en raison de sa non-spécificité [5].

I.4. LA MICROENCAPSULATION

Les systèmes modernes d'administration de médicaments offrent de nombreux bénéfices en comparaison avec les traitements multidoses traditionnels. L'effort de recherche pour l'élaboration de ces nouveaux systèmes s'est majoritairement focalisé sur les formes posologiques à libération maîtrisée et prolongée. On déploie actuellement d'importants efforts pour assurer une administration optimale du médicament disposant de diverses méthodes pour régir un agent thérapeutique au lieu visé grâce à une libération prolongée contrôlée. Une de ces méthodes implique l'utilisation de microparticules comme transporteurs de médicaments. La microencapsulation offre la possibilité de modifier et de ralentir la libération des médicaments par des formes galéniques spécifiques. Un système de gestion contrôlée des médicaments bien élaboré peut pallier certains inconvénients des traitements traditionnels et optimiser l'efficacité d'un médicament typique [6].

I.4.1. Définition de la microencapsulation

La microencapsulation est un procédé par lequel de petites particules solides ou de fines gouttelettes liquides sont entourées d'une enveloppe intacte, qui à son tour les isole et les protège de l'environnement extérieur [6]. Les produits obtenus par ce processus sont appelés microparticules « microcapsules ou microsphères » qui se différencient par leur morphologie et leur structure interne.

I.4.2. Classification des microparticules

Lorsque la taille des particules est inférieure à 1 μm , elles sont appelées respectivement nanocapsules ou nanosphères, et les particules ayant un diamètre compris entre 3 et 800 nm sont appelées microcapsules ou microsphères. Les particules de plus de 1000 nm sont appelées macroparticules [7].

Selon Dubey et al, les microparticules peuvent être classées en trois catégories de base, les types monocœur, polycœur et matriciel, comme le montre la figure I.2 [8].

- Les microparticules monocœur ont une seule chambre creuse à l'intérieur de la particule
- Les microparticules polycœur ont un certain nombre de chambres de tailles différentes à l'intérieur de l'enveloppe.
- La microparticule de type matriciel aux ingrédients intégrés dans la matrice du matériau de l'enveloppe. Cependant, la morphologie de la structure interne d'une

microparticule dépend largement des matériaux de l'enveloppe sélectionnés et des méthodes de microencapsulation utilisées.

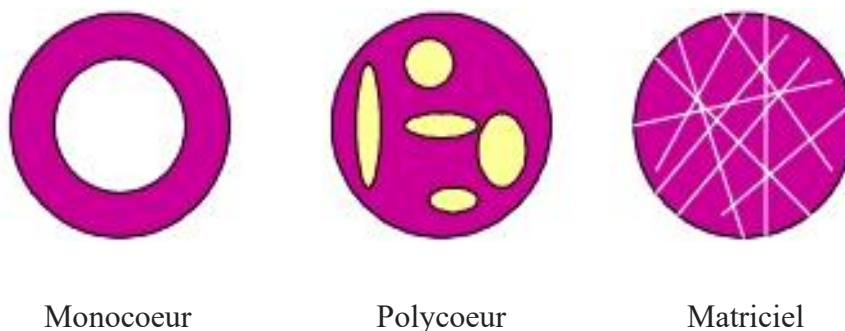


Figure I.2 : Différents types de microparticules.

I.4.3. Techniques de microencapsulation

Différentes méthodes d'encapsulation des matériaux de base permettent d'obtenir ces microparticules. Elles sont habituellement classées en trois catégories. Le tableau expose les diverses méthodes de microencapsulation [7] :

Tableau I.1. Différentes techniques utilisées pour la microencapsulation

Procédé chimique	Procédé physico-chimique	Procédé mécanique
Polymérisation interfaciale	Coacervation et séparation de phases	Séchage par atomisation et congélation
Polymérisation in situ	Encapsulation sol-gel	Revêtement en lit fluidisé
Polycondensation	Evaporation de solvant	Encapsulation par extrusion

La technique de microencapsulation a plusieurs avantages tels que, l'immobilisation des micro-organismes et des enzymes, la protection contre (les UV, la chaleur, l'oxydation, les acides, les bases), amélioration de durée de conservation grâce à la prévention des réactions de dégradation, masquage du goût ou des odeurs, amélioration du traitement, de la texture et réduction du gaspillage d'ingrédients, et manipulation des liquides comme des solides [9].

I.4.4. Encapsulation par évaporation de solvant

La microencapsulation par évaporation de solvant est largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique, cette méthode comprend trois phases : le noyau, le matériau d'enrobage et le véhicule de fabrication liquide [7]. Dans cette méthode, le matériau de base (principe actif) à encapsuler est dissous ou dispersé dans la solution de polymère d'enrobage. Sous agitation, le mélange noyau-matériau d'enrobage est dispersé dans la phase liquide du véhicule de fabrication afin d'obtenir des microparticules de taille appropriée. L'agitation du système est poursuivie jusqu'à ce que le solvant se répartisse dans la phase aqueuse et soit éliminé par évaporation [6].

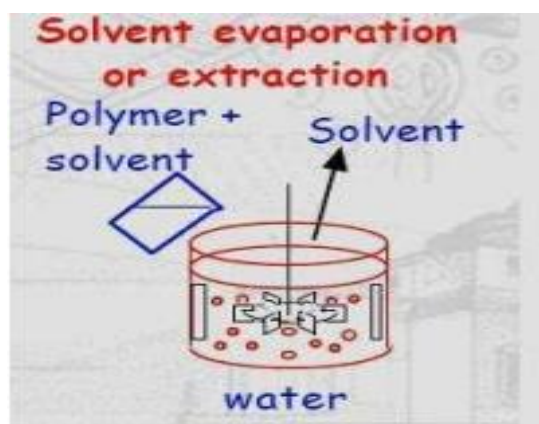


Figure I.3 : Encapsulation par évaporation de solvant.

I.5. APPROCHES ACTUELLES DE LA MICROENCAPSULATION

Des microparticules chargées en amoxicilline (AMO) ont été préparées et caractérisées par Abdelmalek et al [10]. Ces particules ont été obtenues par évaporation de solvant (H/E) en utilisant la β -cyclodextrine (β -CD) et l'acétate-phtalate de cellulose (CAP) comme matrice. Cette étude vise à étudier l'effet des matrices utilisés sur l'efficacité d'encapsulation et la cinétique de libération du médicament. Les micrographies de microscopie électronique à balayage (MEB) ont montré que les microsphères étaient lisses, rigides et poreuses avec différentes formes. L'efficacité d'encapsulation variait entre 71 et 86% et le diamètre moyen variait entre 184 et 250 μm . Les microsphères préparées ont été exposés à deux souches bactériennes d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* à différentes concentrations et les zones d'inhibition ont été déterminées, confirmant la stabilité de l'activité de l'AMO après encapsulation. La présente étude a démontré l'effet de la matrice choisie sur les caractéristiques des microsphères et leur libération in vitro grâce à la technique de microencapsulation par

évaporation de solvant. Le profil de libération a montré que l'utilisation de β -CD favorisait la libération d'AMO.

Certains principes actifs présentent une courte demi-vie biologique, comme le céfixime (CFX), dont la demi-vie est de 3 à 4 heures. Cette caractéristique rend son administration biquotidienne pendant 7 à 14 jours contraignante pour le patient, augmentant ainsi le risque d'oubli de dose. Le céfixime appartient à la classe des antibiotiques bêta-lactamines et bénéficie d'une grande popularité en raison de son efficacité antibactérienne et de la faible incidence d'effets secondaires. Les médecins recommandent généralement de suivre le traitement antibiotique jusqu'à son terme afin de garantir l'éradication complète des bactéries pathogènes. La formulation de produits à libération prolongée vise à maintenir une concentration plasmatique constante afin d'éviter les pics et creux typiques des formulations conventionnelles. Le travail présenté par Razkan et al s'est concentré sur le développement d'une formulation de microsphères à libération prolongée de céfixime pour réduire la fréquence de dosage, améliorer l'activité antibactérienne et l'observance du traitement par le patient. L'encapsulation du CFX dans des microsphères Ethyle cellulose (EC) a permis d'atteindre cet objectif, et la formulation optimisée a permis une libération prolongée jusqu'à 24 heures. Le temps maximal a été de 8 h, contre 4 h pour la formulation commercialisée. L'efficacité antibactérienne et la biodisponibilité du CFX ont été multipliées par deux. La formulation développée pourrait donc contribuer à améliorer la résistance aux antimicrobiens et l'observance thérapeutique des patients [11].

Le choix du polymère comme matrice dans le processus de la micro encapsulation influence sur les caractéristiques des microparticules tel que la forme, la taille, la dispersion, le rendement, l'efficacité et la libération du médicament, c'est ce que nous présentés dans le travail de Shirani et al, qui a réalisé la microencapsulation du 2-aminothiazole comme agent antithyroïdien utilisant la technique d'évaporation du solvant soit par du poly(butylsuccinate) (PBS) comme matrice polyester biodégradable synthétisée et bien caractérisée, soit par de l'Ethylcellulose (EC10) comme matrice polymère biocompatible afin de comparer les caractéristiques des microparticules. En outre, un vaste travail d'analyse cinétique et mathématique a été effectué pour établir expérimentalement divers taux de libération. Toutefois, ces recherches ont révélé que les émulsifiants et le nombre de lames, considérés comme des paramètres physico-chimiques, influencent fortement les propriétés des microparticules créées, telles que leur taille, leur forme, leur surface et leur morphologie. De plus, cela affecte certainement le taux du principe actif chargé et par conséquent la libération de l'agent actif encapsulé. Dans cette étude, toutes les préparations aboutissent à une forme

sphérique homogène de microparticules. Cependant, la préparation utilisant du PBS en tant que matrice polyester biodégradable et du PVA comme émulsifiant employant quatre couches donne une bonne dispersion mais un rendement faible. Cependant, l'EC avec du PVA en tant qu'émulsifiant, utilisant 4 palles offrent une matrice améliorée et une dispersion unitaire, et un rendement élevé. La nature de la matrice a un impact considérable sur la libération des médicaments. Effectivement, la dynamique de libération du médicament déterminée par expérimentation et théorie coïncide parfaitement, confirmant ainsi la justesse du modèle sélectionné. L'expansion, la dissolution et le gonflement sont les processus clés qui gouvernent l'ensemble du mécanisme de libération du médicament. Finalement, l'atout fonctionnel des modèles réside dans la capacité à déterminer le mécanisme de libération du médicament à partir de nos microparticules intégrées dans diverses matrices biodégradables pour atteindre les profils de libération désirés, ce qui facilite l'élaboration d'un nouveau promédicament microencapsulé [12].

I.6. L'ÉTAT DE L'ART DES ACTIVITES BIOLOGIQUES

I.6.1. Activités antioxydant

Puisque les radicaux libres jouent un rôle important dans l'apparition de diverses maladies, l'intérêt scientifique pour la découverte d'antioxydants naturels provenant de plantes médicinales a largement progressé ces dernières années. Cette recherche a pour but d'identifier les métabolites secondaires par le biais de réactions de coloration et/ou de précipitation, dans l'objectif de procéder à leur quantification. Pour les différents essais, des feuilles de *Commelina benghalensis* ont été utilisées. L'activité de neutralisation des radicaux libres a été évaluée à l'aide des tests de réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) et de l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)). Les analyses ont révélé une forte concentration en flavonoïdes, phénols, anthraquinones et glycosides, une concentration modérée en saponines, ainsi que la présence d'alcaloïdes. En revanche, les tanins étaient absents. La teneur en polyphénols totaux était de 74,13 mg EAG/g d'extrait, tandis que celle en flavonoïdes atteignait 61,27 mg ER/g.

L'activité antioxydante était également notable, comme en témoigne la capacité de piégeage des radicaux libres DPPH (IP = 65,03 %) et la réduction du fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} (IP = 50,68 %). Par ailleurs, l'étude a mis en évidence une action anti-hémolytique significative ($126,79 \pm 1,28$ pour l'extrait aqueux contre $82,49 \pm 1,35$ pour le diclofénac), ainsi qu'une capacité de dénaturation des protéines par les différents extraits de feuilles de *C. benghalensis* ($62,32 \pm 1,02$ pour l'extrait aqueux contre $53,29 \pm 0,46$ pour le diclofénac).

Ces résultats mettent en lumière l'activité antioxydante et anti-inflammatoire de l'extrait aqueux des feuilles de *Commelina benghalensis*, ce qui pourrait justifier son utilisation traditionnelle dans le traitement de l'hypertension artérielle [13]. En raison de la crise croissante de la résistance aux antibiotiques dans de nombreux hôpitaux à travers le monde, il devient impératif d'enrichir notre arsenal d'agents anti-infectieux. Par ailleurs, les effets délétères du stress oxydatif sur la santé humaine suscitent une inquiétude grandissante. Les antioxydants de synthèse, tels que le butylhydroxytoluène (BHT), couramment utilisés dans l'industrie agroalimentaire, sont suspectés d'induire des lésions hépatiques et de favoriser la carcinogenèse. Cette situation a conduit à un intérêt accru pour l'utilisation d'agents antioxydants et antimicrobiens d'origine naturelle.

De nombreuses plantes médicinales contiennent des molécules bioactives, telles que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tanins, les caroténoïdes, les stérols et les terpénoïdes. Dans ce contexte, la présente étude *in vitro* s'est penchée sur les propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des extraits organiques et de l'extrait aqueux issus des feuilles et des inflorescences du *Marrubium vulgare*. L'activité antioxydante a été évaluée à l'aide du test de piégeage du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) et du test de décoloration du β -carotène. L'activité antimicrobienne a quant à elle été mesurée à l'aide de la méthode de diffusion en gélose.

L'analyse qualitative des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM) a permis d'identifier la présence d'acide gallique et de quercétine, tout en révélant l'absence d'atropine. Par ailleurs, la détection de l'activité antiradicalaire par CCM a montré que celle-ci était majoritairement localisée dans l'extrait méthanolique brut (EMeOH). L'évaluation des composés phénoliques totaux (via la méthode de Folin-Ciocalteu) et des flavonoïdes (par la méthode au chlorure d'aluminium) a indiqué des concentrations plus élevées dans l'EMeOH, avec des valeurs respectives de $3,42 \pm 0,85$ mg EAG/g d'extrait et $18,0 \pm 0,75$ mg EQ/g d'extrait, mesurées par spectrophotométrie.

Aucune activité antimicrobienne n'a été détectée pour *Marrubium vulgare* vis-à-vis des souches testées (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*). Le test au β -carotène a révélé trois phases distinctes — phase de latence, phase de génération et phase d'épuisement — au cours desquelles l'EMeOH s'est distingué par une activité antioxydante marquée (63,77 %). L'évaluation quantitative de l'activité antiradicalaire a montré que l'EMeOH possédait la plus forte activité ($IC_{50} = 1,5$ μ g/ml), bien que la quercétine utilisée comme contrôle de référence ait présenté une activité légèrement supérieure ($IC_{50} = 0,81$ μ g/ml). Cela suggère la présence de composés actifs au fort potentiel réducteur du DPPH.

Ces composés, caractérisés par une forte polarité, ont été identifiés dans l'EMeOH par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) comme appartenant à la famille des glycosides de phénylpropanoïdes. Nos résultats soulignent l'intérêt du *Marrubium vulgare* d'Algérie pour des applications pharmaceutiques et phytothérapeutiques. En nous fondant sur ces données, il est possible de conclure que cette plante représente une source naturelle prometteuse de composés antioxydants [14].

I.6.2. Activités antibactériennes

Depuis l'Antiquité, les huiles essentielles (HE) sont reconnues pour leurs propriétés antiseptiques notables. Leur usage s'est étendu à divers domaines, notamment la pharmacie, l'industrie cosmétique et l'agroalimentaire. En médecine traditionnelle, elles sont fréquemment utilisées pour leurs vertus antimicrobiennes. Des études antérieures ont mis en évidence l'efficacité antifongique du genre *Thymus*, ce qui a motivé l'élargissement des recherches à l'évaluation de leur activité antibactérienne.

Dans ce cadre, des tests ont été réalisés sur deux souches bactériennes : *Escherichia coli* (Gram négative) et *Staphylococcus aureus* (Gram positive). L'étude a porté sur six huiles essentielles : *Lavandula angustifolia*, *Lavandula latifolia*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* (chénotype carvacrol) et *Thymus zygis* (chénotype thymol).

Les résultats ont révélé que, face à *Escherichia coli*, les huiles essentielles d'origan (*O. vulgare*) et de thym au thymol (*T. zygis*) manifestaient la plus forte activité antibactérienne. En ce qui concerne *Staphylococcus aureus*, l'huile essentielle d'origan s'est distinguée par une efficacité supérieure. Cette activité est principalement attribuée à la présence de composés phénoliques, en particulier le thymol et le carvacrol, connus pour leurs puissantes propriétés antimicrobiennes.

Parmi les huiles essentielles testées, seules celles d'origan et de thym ont démontré une activité antibactérienne significative contre les deux souches étudiées. Ces résultats confirment le rôle central des phénols dans l'efficacité antibactérienne des HE. Bien que les premières publications scientifiques sur le sujet remontent à une trentaine d'années, la nécessité de poursuivre les recherches demeure, notamment en ciblant des souches bactériennes émergentes ou multirésistantes, fréquentes en milieu hospitalier.

Enfin, dans les industries agroalimentaire et cosmétique, les huiles essentielles pourraient représenter une alternative prometteuse aux conservateurs et antioxydants de synthèse, dans une optique de naturalité et de sécurité accrue des formulations [15]. Les plantes renferment une grande diversité de composés biologiquement actifs, dont plusieurs ont démontré des

propriétés antimicrobiennes significatives. Depuis des millénaires, les médicaments à base de plantes occupent une place centrale dans les systèmes de soins traditionnels à travers le monde. L'intérêt croissant pour les plantes médicinales en tant que sources potentielles de nouveaux agents antimicrobiens s'inscrit dans un contexte marqué par la montée inquiétante de la résistance bactérienne aux antibiotiques conventionnels. Cette situation souligne l'urgence de découvrir de nouvelles molécules thérapeutiques efficaces.

De nombreuses espèces végétales ont été utilisées à des fins médicinales par les peuples autochtones d'Australie. Toutefois, peu d'entre elles ont fait l'objet d'études scientifiques approfondies portant sur leurs propriétés antimicrobiennes et antivirales. Il apparaît donc essentiel de consolider les connaissances empiriques par des données scientifiques robustes, afin d'explorer le potentiel pharmacologique de ces plantes traditionnelles.

Une étude récente a mis en évidence les propriétés antivirales de certains extraits issus de plantes médicinales australiennes utilisées pour le traitement de symptômes infectieux. Afin de compléter ces résultats, la présente étude s'est attachée à évaluer les propriétés antibactériennes de ces extraits. L'activité antibactérienne a été testée sur huit souches bactériennes d'importance médicale, comprenant quatre bactéries Gram-positives (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes*) et quatre bactéries Gram-négatives (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhimurium*).

Au total, cinquante-six extraits éthanoliques, obtenus à partir de différentes parties de 39 plantes utilisées en médecine traditionnelle autochtone australienne, ont été évalués à l'aide de la méthode de diffusion en gélose. Douze extraits ont montré une activité inhibitrice contre au moins une souche bactérienne, et cinq d'entre eux ont démontré une activité à large spectre contre les bactéries Gram-positives. La souche *Bacillus cereus* s'est révélée la plus sensible, tous les extraits actifs montrant une inhibition contre cette espèce. Les extraits de feuilles appartenant au genre *Eremophila* (famille des Myoporaceae) se sont distingués par leur forte activité antibactérienne, en particulier *Eremophila duttonii*, qui a présenté la plus grande efficacité contre les souches Gram-positives. Des études de croissance temporelle ont été menées pour approfondir l'évaluation des effets antibactériens de *E. duttonii*. Ces tests ont révélé une inhibition significative de la croissance bactérienne dans un délai d'une heure pour *B. cereus*, *E. faecalis* et *S. aureus*, et de deux heures pour *S. pyogenes*, lorsque les cultures étaient incubées en présence de l'extrait [16].

I.6.3. Activités anti-inflammatoires

L'inflammation est une réponse biologique complexe des tissus vasculaires à divers agents agressifs, tels que les pathogènes, les irritants ou les cellules endommagées. Elle peut être classée en deux formes : aiguë ou chronique. Cette réaction implique une cascade d'événements biochimiques mobilisant le système vasculaire local, le système immunitaire, ainsi que différents types cellulaires présents dans les tissus affectés. L'inflammation aiguë constitue la première réponse de l'organisme. Elle se manifeste par une augmentation de la perméabilité vasculaire et par la migration des cellules immunitaires innées, telles que les neutrophiles et les macrophages, du sang vers le site de la lésion. En revanche, l'inflammation chronique se caractérise par un processus évolutif, marqué par un changement dans la nature des cellules impliquées au niveau du foyer inflammatoire, ainsi que par une coexistence de phénomènes de destruction tissulaire et de réparation.

Face à la nécessité de découvrir de nouveaux agents anti-inflammatoires, des efforts considérables ont été déployés pour développer des composés efficaces dans le traitement de l'inflammation. Ce processus pathologique altère considérablement la qualité de vie et réduit la productivité globale, engendrant des pertes économiques substantielles.

La présente revue s'intéresse à l'activité anti-inflammatoire de 32 monoterpènes bioactifs présents dans les huiles essentielles. Les données recueillies mettent en évidence le potentiel pharmacologique de ces composés naturels en tant qu'agents thérapeutiques anti-inflammatoires. Les monoterpènes étudiés ont démontré une activité anti-inflammatoire significative dans divers modèles expérimentaux liés à l'inflammation.

Les résultats soulignent le rôle essentiel des monoterpènes dans l'activité anti-inflammatoire de nombreuses plantes médicinales et aromatiques. Ce potentiel thérapeutique suggère que ces composés pourraient constituer une base prometteuse pour le développement de nouveaux médicaments. De ce fait, ils devraient susciter l'intérêt accru des chercheurs et des industries pharmaceutiques pour des investigations cliniques approfondies et d'autres applications thérapeutiques ciblant les pathologies inflammatoires [17]. La recherche de médicaments alternatifs capables d'interférer efficacement avec les processus inflammatoires constitue aujourd'hui une priorité en pharmacologie, notamment dans l'objectif de limiter les effets secondaires associés aux traitements conventionnels. Les huiles essentielles représentent une source prometteuse de telles substances, car leurs constituants actifs présentent une large gamme de propriétés pharmacologiques, incluant une activité anti-inflammatoire significative.

Cette revue propose un aperçu des effets anti-inflammatoires exercés par les phénylpropanoïdes présents dans les huiles essentielles, en abordant les mécanismes d'action

potentiels mis en évidence à travers différents modèles expérimentaux. Les huiles essentielles sont des composés volatils naturels, fortement odorants, produits par les plantes aromatiques en tant que métabolites secondaires. Elles se composent de mélanges complexes de substances présentes en proportions variables, principalement des constituants terpéniques et phénylpropanoïdiques.

Historiquement, les huiles essentielles ont été utilisées à des fins médicinales diverses, allant du traitement des affections cutanées à celui de certaines formes de cancer. Elles sont également reconnues pour leurs propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires, sédatives et analgésiques.

Les phénylpropanoïdes forment une vaste classe de composés organiques produits par les plantes en réponse à divers stress, tels que les infections, les radiations ultraviolettes, les blessures ou les attaques d'herbivores. Ils sont synthétisés à partir de la phénylalanine, un acide aminé qui est d'abord transformé en acide cinnamique. La réduction du groupe carboxyle de ce dernier conduit à la formation d'aldéhydes (comme le cinnamaldéhyde), puis, par réduction supplémentaire, à des monolignols tels que les phénylpropènes (par exemple, l'eugénol ou le safrole).

Les phénylpropanoïdes, qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique, sont actuellement utilisés pour leurs propriétés pharmacologiques diverses. Ils suscitent un intérêt croissant dans le cadre de la recherche de nouveaux agents anti-inflammatoires, en particulier ceux d'origine végétale. Les données présentées dans cette revue soulignent le rôle potentiel des phénylpropanoïdes comme substances actives dans le traitement de l'inflammation.

Les publications scientifiques existantes rapportent l'implication des phénylpropanoïdes dans divers mécanismes d'action, notamment l'immunomodulation et la suppression de la réponse inflammatoire, démontrée à travers des études *in vitro* et *in vivo*. Des recherches complémentaires, notamment des essais cliniques, sont nécessaires afin de valider leur efficacité et leur sécurité d'utilisation comme agents thérapeutiques dans le traitement des maladies inflammatoires [18]. Suite à l'examen de diverses études sur les supramoléculaires et la microencapsulation, l'idée nous est venue de fusionner différents agents actifs et d'observer les modifications susceptibles d'apparaître dans leurs caractéristiques et leurs activités biologiques.

Références rappels bibliographiques

1. Rigny, P. (2011). La chimie supramoléculaire et ses formes modernes. *L'Act. Chim.*, 348–349.
2. Gómez-González, B., García-Río, L., Basílio, N., Mejuto, J. C., & Simal-Gandara, J. (2021). Molecular recognition by Pillar [5] arenes: evidence for simultaneous electrostatic and hydrophobic interactions. *Pharmaceutics*, 14(1), 60.
3. Bellavita, R., Braccia, S., Falanga, A., & Galdiero, S. (2023). An overview of supramolecular platforms boosting drug delivery. *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2023(1), 8608428.
4. Asela, I., Donoso-Gonzalez, O., Yutronic, N., & Sierpe, R. (2021). β -Cyclodextrin-based nanosponges functionalized with drugs and gold nanoparticles. *Pharmaceutics*, 13(4), 513.
5. Tang, L., Zhang, A., Mei, Y., Xiao, Q., Xu, X., & Wang, W. (2021). NIR light-triggered chemo-phototherapy by ICG functionalized MWNTs for synergistic tumor-targeted delivery. *Pharmaceutics*, 13(12), 2145.
6. Venkatesan, P., Manavalan, R., & Valliappan, K. (2009). La microencapsulation : une technique essentielle pour un nouveau système d'administration de médicaments. *J. Pharm. Sci. Res.*, 1(4), 26–35.
7. Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., & Srawan, G. Y. (2010). Techniques de microencapsulation, facteurs influençant l'efficacité de l'encapsulation. *J. Microencapsul.*, 27(3), 187–197.
8. Dubey, R., Shami, T. C., & Rao, K. U. (2009). Microencapsulation technology and applications. *Def. Sci. J.*, 59(1), 82–95.
9. Chaudhuri, A., & Ray, S. (2021). *Int. J. Pharm. Bio Sci.*
10. Abdelmalek, I., Mouffok, M., Bennabi, L., & Mesli, A. (2021). Préparation, caractérisation et activité microbiologique de microsphères à base d'acétate de cellulose phtalate/ β -cyclodextrine chargées en amoxicilline et leur comportement de libération contrôlée. *Rev. Roum. Chim.*, 66(6), 527–536.
11. Razdan, K., Sahajpal, N. S., Singh, K., Singh, H., & Jain, S. K. (2019). Formulation de microsphères de céfixime à libération prolongée avec une biodisponibilité orale et un potentiel antibactérien améliorés. *Ther. Deliv.*, 10(12), 769–782.
12. Chirani, S., Lebig, M. O., Bouameur, S., Mouffok, M., Chirani, N., Chafi, N., & Guemra, K. (2017). Élaboration de capsules de microsphères à base d'éthylcellulose et

de poly(butylsuccinate) synthétisé comme matrices biodégradables pour l'administration d'un agent antithyroïdien. *IJPER*, 51(2S), S79–S90.

13. Maguirgue, K., Wangso, H., Oksom, J. B. S., Bakaranga-Via, I., Nadjioroum, N. A., & Otchom, B. B. (2022). Evaluation phytochimique, potentiels antioxydants et anti-inflammatoires in vitro des extraits des feuilles de *Commelina benghalensis* Linn. (Commelinaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 16(6), 2673–2684.
14. Ghedadba, N., Bousselsela, H., Hambaba, L., Benbia, S., & Mouloud, Y. (2014). Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie*, 12(1), 15–24.
15. Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., & Vergnes, M. F. (2008). Étude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*, 6(3), 160–164.
16. Palombo, E. A., & Semple, S. J. (2001). Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(2–3), 151–157.
17. De Cássia da Silveira e Sá, R., Andrade, L. N., & De Sousa, D. P. (2013). A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, 18(1), 1227–1254.
18. Sá, R. D. C. D. S. E., Andrade, L. N., de Oliveira, R. R. B., & de Sousa, D. P. (2014). A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. *Molecules*, 19(2), 1459–1480.



CHAPITRE II :
PARTIE EXPERIMENTALE

II.1. INTRODUCTION :

Dans le cadre de ce travail, nous visons à synthétiser et caractériser plusieurs supramolécules résultant de la combinaison rationnelle de différents agents actifs. Par la suite, nous procéderons à la formulation de microparticules chargées en principes actifs. Ces systèmes seront évalués à travers des tests biologiques afin d'étudier leur efficacité, et une analyse cinétique sera réalisée à partir des microsphères obtenues afin de mieux comprendre le profil de libération des composés encapsulés.

II.2. PRODUITS UTILISES

Amoxicilline : L'amoxicilline est une aminopénicilline créée en ajoutant un groupe amino supplémentaire à la pénicilline pour lutter contre la résistance aux antibiotiques. Il est indiqué pour le traitement des infections causées par des isolats sensibles de bactéries sélectionnées, spécifiquement celles qui sont négatives pour la bêta-lactamase, y compris les infections de l'oreille, du nez et de la gorge, les infections des voies respiratoires inférieures et des voies urinaires, la sinusite bactérienne aiguë, ainsi que les infections de la peau et des structures [1]. L'amoxicilline est efficace contre une large gamme de bactéries à Gram positif, offrant une couverture supplémentaire contre certains organismes à Gram négatif par rapport à la pénicilline [1]. Ce produit est fourni par thermo scientific.

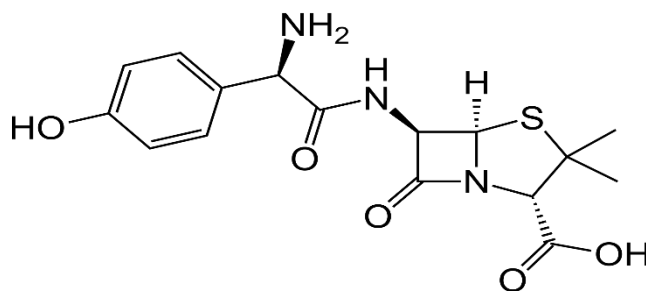


Figure II.1 Structure Chimique de l'amoxicilline.

Ampicilline : L'ajout d'un groupe amino à la molécule de benzylpénicilline a abouti à la création de l'ampicilline, un médicament à spectre d'activité élargi [2].

Ampicilline est un antibiotique de β -lactam avec un large spectre d'activité antibactérienne contre les bactéries Gram-positives, Gram-négatives et anaérobies [3]. Ce produit est fourni par thermo scientific.

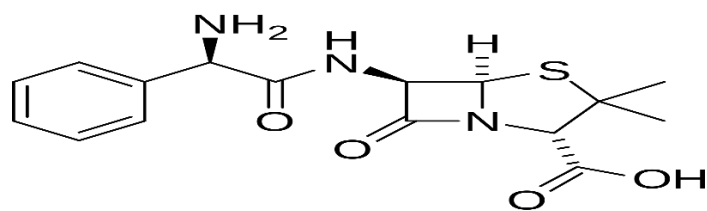


Figure II.2 : Structure Chimique de l'ampicilline

Acide niflumique : L'acide niflumique (NA), un anti-inflammatoire non stéroïdien [4]. Il traite les maladies rhumatoïdes inflammatoires et soulage les douleurs aiguës. Il est utilisé pendant la période des douleurs et après les chirurgies [5]. Ce produit est fourni par SIGMA.

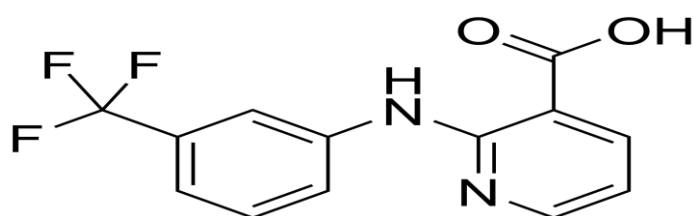


Figure II.3 : Structure Chimique de l'acide niflumique.

Chloramphénicol : Le chloramphénicol est un agent antimicrobien utilisé rarement aujourd'hui aux États-Unis en raison de ses effets indésirables associés. À une époque, il était salué comme un agent à large spectre très efficace contre de nombreuses bactéries à Gram positif et à Gram négatif, les spirochètes, les chlamydiae et les rickettsies. Le chloramphénicol a joué un rôle majeur dans le traitement de la méningite causée par *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Neisseria meningitidis* en raison de son activité bactéricide contre ces organismes et de sa capacité à atteindre des concentrations élevées dans le liquide céphalorachidien [6]. Ce produit est fourni par thermo scientific.

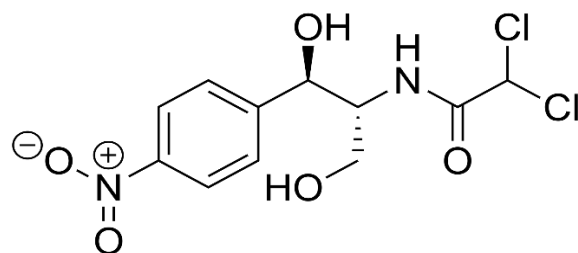


Figure II.4 : Structure Chimique de chloramphénicol.

- **Diclofenac** : hikma
- **Acétone** : extra pure, MERCK.
- **Ethanol** : pureté 96% vol, BDH CHEMICALS
- **Chloroforme** : pureté $\geq 99.8\%$
- **Dichlorométhane** : BIOCHEM
- **Diméthylsulfoxyde**: Supelco
- **Méthanol** : pureté $\geq 99.7\%$, Riedel-de Haën
- **Tween 80** : SIGMA
- **Éthylcellulose** : éthoxylé à 48% provenant de Flucka analytical (USA)
- **Chlorure de sodium** : M= 58.44 g/mol, BIOCHEM CHEMOPHARMA
- **Acide chlorhydrique 36,5-38%** : Honeywell /Fluka
- **2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle** : SPECILAB
- **Sérum bovine albumin**
- **Solution Tampon au phosphate** : IDEAL LABO
- **Les milieux biologiques utilisés sont** : Gélose Mueller-Hinton, Gélose nutritive, Gélose Chapman, Gélose EMB.

II.3. PREPARATION DES SUPRAMOLECULES

Dans ce cadre expérimental, trois supramolécules (S1, S2 et S3) ont été élaborées à partir de deux principes actifs différents. Pour cela, 0,5 g de chacun des principes actifs a été placé dans un bécher et dissous dans 10 mL d'eau. On soumet le mélange à un rayonnement micro-ondes pendant une durée de 10 minutes, et on obtient alors une poudre, qui est la supramolécule.

Tableau II.1 : Les compositions des supramolécules

Code	Composition
S1	0,5g Amoxicilline+0,5g Ampicilline
S2	0,5g Amoxiciline+0,5g Acide niflumique
S3	0,5g Amoxicilline+0,5g Chloramphénicol



Figure II.5 : La micro-onde utilisée pendant la préparation des supramolécules.

II.4. PREPARATION DES MICROSPHERES

On prépare deux lots de microparticules chargées d'amoxicilline seul et de S1 par méthode d'évaporation de solvant. Pour cela, deux solutions ont été préparées « une phase organique et une phase aqueuse ». Cette technique se base sur l'émulsion de ces phases, ou la phase organique sera dispersée sous forme de gouttelettes huileuses dans la phase continue sous une agitation mécanique (750 tours/min), le solvant volatil s'évapore et les gouttelettes se solidifie, à la fin les microsphères sont récupérées par filtration et lavage à plusieurs fois par l'eau distillé.

Tableau II.2 : Les compositions des microsphères

Code	Phase organique	Phase aqueuse
MS1	0,5g d'amoxicilline + 1g d'éthylcellulose + 60mL de dichlorométhane.	50mL d'eau distillé + 1% de tween 80.
MS2	0,5g de S1 + 1g d'éthylcellulose + 60mL de dichlorométhane.	



Figure II.6 : Le montage utilisé dans la préparation des microsphères

II.5. TECHNIQUES DE CARACTERISATION

Les supramolécules et les particules préparées seront ensuite soumises à diverses méthodes de caractérisation, telles que décrites ci-dessous :

- **Analyse par UV-Visible :** Un spectrophotomètre UV-vis (UV1650PC–SHIMADZU) équipé d'une cuve en quartz d'une longueur de trajet de 1 mm a été utilisé. Cette analyse a été effectuée au Laboratoire de Synthèse et Catalyse de l'Université IBN Khaldoun – Tiaret.
- **Test de solubilité :** On a testé la solubilité des agents actifs et supramolécules dans un ensemble de solvants.
- **Détermination de la quantité d'agent actif encapsulé :** La quantité d'agent actif encapsulé dans les microsphères a été évaluée par la méthode d'extraction dans un solvant approprié pendant une durée suffisante pour la solubilisation (0,1 g de microsphères introduits dans 100 mL de pH=1,2/méthanol (30/70) sous agitation pendant 48 heures). Ensuite, la solution obtenue a été analysée par spectrophotométrie UV-VIS pour calculer la masse de l'agent actif extrait des microcapsules. Le rendement (Rdt%) et la teneur en microencapsulation (%) sont définis par les équations suivantes :

$$\text{Rdt}\% = (m_{\text{pa}} \text{ extrait} / m_{\text{pa}} \text{ initial}) * 100 \quad (1)$$

$$\text{Teneur}\% = (m_{\text{pa}} \text{ extrait} / m \mu\text{-capsules}) * 100 \quad (2)$$

➤ **Distribution de taille** : La connaissance de la taille et la distribution en taille des particules sont essentielle pour la description des systèmes d'émulsion, les suspensions, et les poudres. Cette caractéristique physique du système dépendante des conditions opératoires de fabrication qui peut affecter les propriétés chimiques, physiques et mécaniques du système de particules.

Si le système est constitué de particules de même taille, on parle d'un système monodisperse. Dans le cas contraire, il s'agit d'un système polydispersé s'il est constitué de particules de différentes tailles.

La taille des particules de forme sphérique est représentée par un diamètre moyen. La littérature fait apparaitre plusieurs types de diamètres calculés de différentes manières selon les techniques utilisées. Dans ce travail et pour caractériser la taille des microparticules, on a utilisé trois diamètres moyens : en nombre, en surface et en masse.

Ces diamètres seront calculés comme suit [7] :

Si :

- "i" est la classe des particules.
- "ni" nombre de particules de la classe

- Le diamètre moyen en nombre : est calculé à partir du dénombrement des particules de même diamètre, mathématiquement, il est défini par :

$$d_{10} = \frac{\sum n_i d_i}{\sum n_i} \quad (3)$$

- Le diamètre moyen en surface (diamètre de Sauter) : est calculé à partir du dénombrement des particules de même surface, mathématiquement, il est défini par :

$$d_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (4)$$

- Le diamètre moyen en masse : est calculé à partir du dénombrement des particules de même masse, mathématiquement, il est défini par :

$$d_{43} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (5)$$

La polydispersité d'un système de microparticules est définie par le rapport du diamètre moyen en masse sur le diamètre moyen en nombre :

$$\text{Dispersion} = d_{43}/d_{10} \quad (6)$$

Un système monodisperse correspond à une dispersion égale à 1 ; plus s'éloigne de l'unité, plus le système devient polydispersé.

- **Analyse par l'infrarouge** : Au sein du laboratoire de l'Université d'Oran, le spectromètre d'infrarouge (FTIR-8400) a été employé afin d'identifier les bandes caractéristiques de nos produits dans la plage de nombres d'onde allant de 400 à 4000 cm^{-1} .
- **Analyse par DRX** : Cette technique, utilisée pour caractériser les matériaux cristallisés, offre un accès à de nombreuses informations. Elle permet notamment d'identifier les composés cristallins présents dans le matériau ainsi que leur forme cristallographique. Elle fournit des informations sur la structure, les phases, les orientations privilégiées du cristal et d'autres paramètres structuraux tels que la taille moyenne des grains, la tension et les défauts des cristaux. Cette analyse a été réalisée au Laboratoire de Synthèse et Catalyse de l'Université IBN Khaldoun – Tiaret à l'aide d'un appareil (Rigaku-Mini Flex 600).
- **Analyse par microscope optique** : Nos échantillons ont été photographiés par un microscope optique (type OPTICA Axiome 7000) dans le Laboratoire des Reproductions des animaux de la ferme. Ce microscope est lié à un logiciel qui détermine la taille des microsphères.

II.6. CINETIQUE DE LIBERATION

II.6.1. Préparation des milieux reconstitués :

On crée un environnement physiologique semblable à celui du système digestif, avec un pH de 1,2, conformément aux standards établis par la pharmacopée américaine (U.S.P.).

II.6.2. Etude cinétique de la libération :

La cinétique de libération a été réalisée dans le milieu physiologique reconstitué à $T=37^{\circ}\text{C}$, pour cela 0,1g de microsphères (MS1 ou MS2) a été immergée dans 100mL de pH=1,2. Le suivi a été fait par des prélèvements de 1mL chaque instant. Ces volumes ont été ensuite dilués à 10mL par le même milieu d'étude et analysés par spectroscopie UV-visible à λ_{max} de l'agent actif pour mesurer sa concentration.

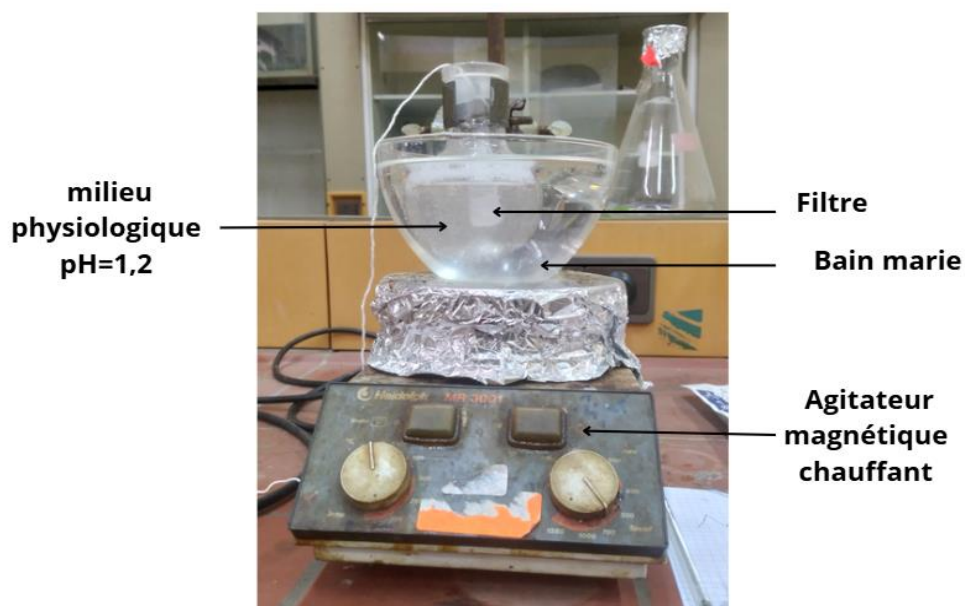


Figure II.7 : Dispositif expérimental de la libération du principe actif.

- **Recherche de λ max :**

La valeur de la longueur d'onde a été déterminée en faisant le spectre U.V d'une solution de l'agent actif dans le milieu (pH=1,2) à une concentration de 10^{-3} mol/L.

La valeur de λ max ainsi trouvée (λ max = 228nm pour l'amoxicilline et λ max = 203nm pour l'ampicilline) est maintenue constante pour suivre le relargage du principe actif étudié.

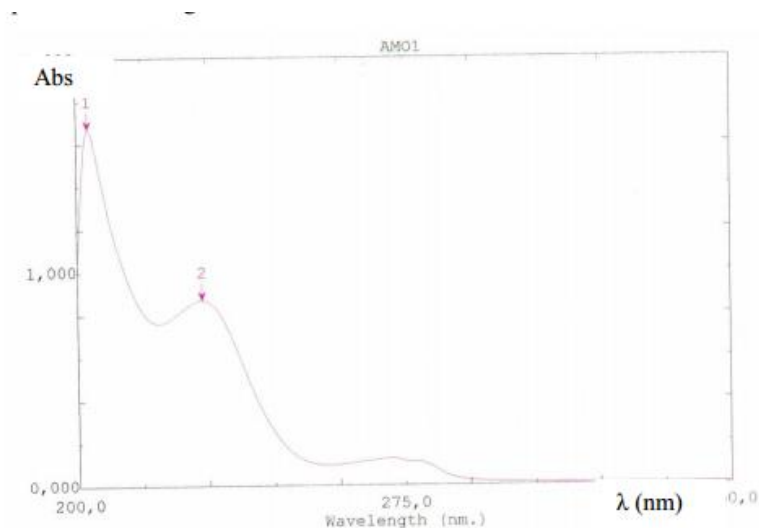


Figure II.8 : Le spectre d'absorption d'amoxicilline dans le milieu pH=1.2.

- **La courbe d'étalonnage d'AMO :**

La Densité Optique (D.O) ou l'Absorbance (A) et la concentration (mol/L) sont liées par la loi de Bér- Lambert :

$$(D.O)_{\max} = \log (I_{\max}/I_0) = \epsilon.l.C$$

$$(D.O)_{\max} = \epsilon.l.C$$

Où :

- **I_{max}/I₀** : est la transmittance.
- **ε** : le coefficient d'absorption spécifique (L.cm⁻¹. mole⁻¹).
- **C** : la concentration en mol/l de la solution.
- **l** : la longueur de la cellule en quartz (1cm).

A partir de 5 solutions de concentrations connues, il est possible de tracer la droite d'étalonnage, permettant de déterminer la valeur de ε de AMO.

La valeur de ε correspond à la valeur de la tangente de la droite (D.O) max = f(C). La valeur du coefficient d'absorption spécifique trouvée est : 1254.54 L.cm⁻¹.mole⁻¹ pour l'amoxicilline et 3873,7 L.cm⁻¹. mole⁻¹ pour l'ampicilline.

La figure II.9 ci-dessous présente la courbe d'étalonnage d'amoxicilline tracée :

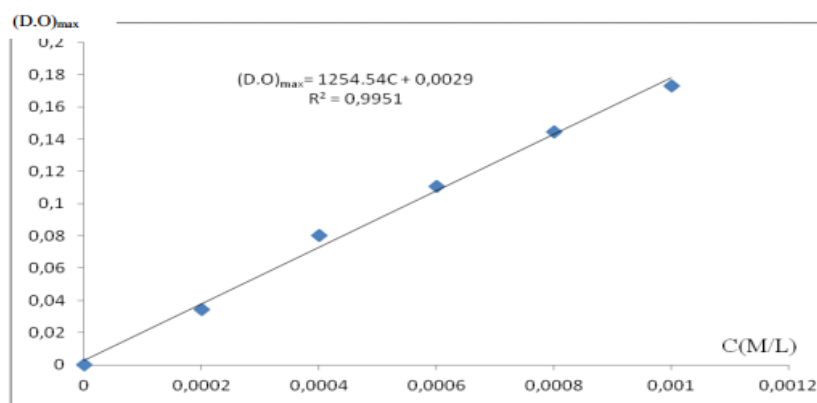


Figure II.9 : La courbe d'étalonnage de AMO.

• **Détermination de la masse et le pourcentage du PA libéré :**

La masse du principe actif libérée (mt) à chaque instant t est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$mt = DO. V_p. V_f.M / \epsilon.V_F. l \quad (7)$$

Avec :

- **V_p** : volume du prélèvement (1mL) ;
- **V_f** : volume de la solution après dilution (10mL) ;
- **V_F** : volume de la solution restante dans le flacon après chaque prélèvement ;
- **M** : masse molaire du PA.

- Le pourcentage du PA libéré (% Pa) est déterminé en appliquant cette loi :

$$\% Pa = (mt/mi).100$$

Avec mi est la masse initiale en PA contenu dans la masse des microsphères choisies pour l'étude de la cinétique du relargage (0,1g).

II.7. TEST BIOLOGIQUE

II.7.1. Test antibiotique :

Nous avons effectué des tests sur les agents actifs, les supramolécules et les microsphères afin d'examiner leurs propriétés antibactériennes. Ces recherches ont été menées dans le laboratoire d'hygiène et de pathologie animale (Institut des sciences vétérinaires) à Tiaret, en utilisant des bactéries à gram positif (*Staphylococcus*) et à gram négatif (*Escherichia Coli*), selon le protocole indiqué ci-dessous :

- **Préparations des souches :**

Initialement, On place les souches dans un incubateur dans une durée de 30min-2h à 37 °C pour les stimuler. Les étapes de préparation sont décrites comme suit :

Milieu de culture : Nous optons pour la gélose nutritive (GN), ce milieu est élaboré dans un bécher en mélangeant la poudre de GN (14 g) avec 500 mL d'eau distillée, conformément aux instructions indiquées sur le contenant.

Ce mélange est agité et chauffé (100–200 °C) jusqu'à l'ébullition par un agitateur magnétique chauffant. Ensuite, le milieu préparé est versé dans des bouteilles de verre stériles, et on les stérilise dans l'autoclave à 121 °C pendant 15 min.

Pour le test, on verse le milieu stérile dans les boîtes de pétri (jusqu'à la moitié à peu près) qui sont à côté de flammes (environnement stérile).



Figure II.10 : Préparation de milieu de culture.



Figure II.11 : Le milieu stérile dans les boîtes de pétri

Inoculation : On introduit un écouvillon stérile dans le tube de souche et on l'applique sur les plaques de pétrie en effectuant un mouvement en zigzag.

Incubation : Nous plaçons les boîtes de Pétri dans l'incubateur pour une durée de 24 heures.

Coloration en gramme : Positionnons une boîte de Pétri à proximité du bec Bunsen, utilisant une pipette Pasteur aseptisée, prélevons un échantillon de bactéries de la boîte et plaçons-le sur une lamelle en ajoutant une goutte d'eau. Par la suite, on soulève cette lame au-dessus d'un bec Bunsen jusqu'à évaporation de l'eau, puis on la soumet à la flamme trois fois afin de fixer la souche. Puis, on incorpore les réactifs dans l'ordre suivant, en les maintenant chacun pour une minute avant de les rincer à l'eau, sauf l'alcool qu'on conserve pendant 20 minutes. On positionne la lame sur laquelle on dépose une goutte d'huile d'immersion pour l'examiner au microscope et ainsi observer les bactéries.



Figure II.12 : Coloration en gramme



Figure II.13 : Analyse par microscope

Repiquage : Il s'agit d'un ensemencement visant à produire une bactérie jeune. Ce repiquage est réalisé dans un milieu de culture sélectif (Gélose Chapman pour la bactérie *Staphylococcus* 27,75g/250mL et Gélose E.M.B pour la bactérie *E. Coli* 9g/250mL) afin d'assurer la croissance des bactéries ciblées tout en prévenant toute contamination.

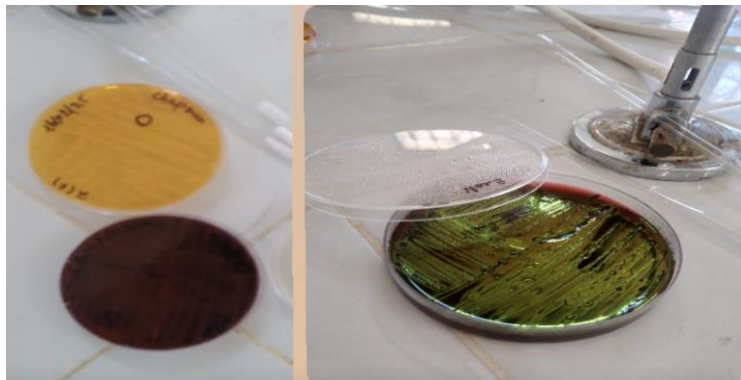


Figure II.14 : Le repiquage dans les milieux sélectifs.

➤ Préparation de l'antibiogramme :

Milieu de culture : la gélose de Muller-Hinton est la plus utilisée pour les tests de sensibilité aux antibiotiques. Ce milieu préparé avec la même méthode précédant, on mélange 19g de la poudre dans 500mL d'eau distillée (selon les instructions mentionnées sur le flacon).

Inoculum : On a prélevé une ou deux colonies de chaque souche et on les a mises dans des tubes contenant de l'eau physiologique (0,9 % NaCl), puis elles ont été bien homogénéisées à l'aide d'un Vortex et analysées dans un spectrophotomètre UV-visible ($\lambda = 625 \text{ nm}$) afin de préparer des suspensions ayant une turbidité équivalente à [0,08-0,13] McFarland.

Ensemencement : L'ensemencement consiste à utiliser un écouvillon stérile plongé dans une suspension bactérienne standardisée pour ensemercer toute la surface gélosée de haut en bas, avec des stries étroitement espacées. Il faut effectuer cette procédure deux fois, en faisant pivoter la boîte pétrie de 60° à chaque fois, et terminer en s'écouvillon le long du bord de la gélose.

Application des disques : On met trois disques de chaque agents actif, supramolécules, microsphère, et le polymère dans une boîte de Pétri. Dans ces boîtes, on écrit le nom du disque et le nom de la bactérie. Puis on les place dans l'incubateur pendant 24 heures, puis on mesure les diamètres des cercles d'inhibition des bactéries avec un pied à coulisse.

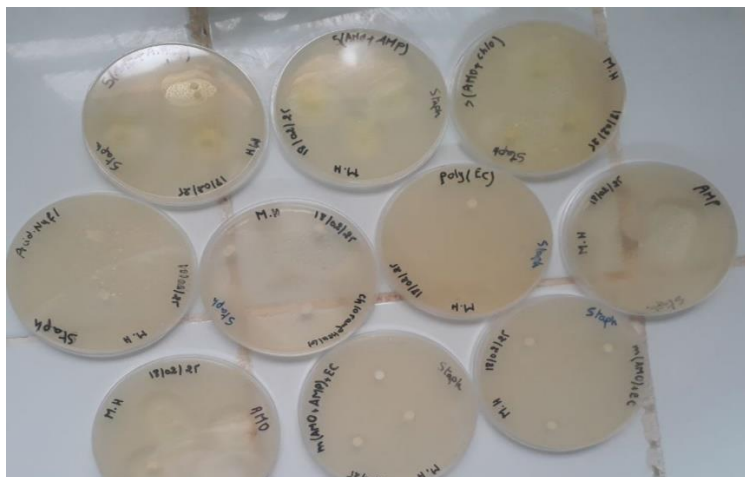


Figure II.15 : Les disques des agents actifs dans les boîtes de pétri.

II.7.2. Test anti inflammatoire :

L'activité anti-inflammatoire est évaluée *in vitro* par la capacité d'un composé à inhiber la dénaturation thermique de l'albumine sérique bovine (BSA). Ce test repose sur le principe selon lequel certains agents inflammatoires provoquent la dénaturation des protéines, un phénomène également observé lors de réactions inflammatoires *in vivo*. Ainsi, la stabilisation de la structure native de la BSA en conditions thermiques élevées constitue un indicateur de l'effet anti-inflammatoire potentiel d'une molécule. Une inhibition significative de la dénaturation de la BSA suggère une capacité du composé à prévenir ou atténuer les altérations protéiques associées à l'inflammation [8]. Ce test se compose de quatre étapes :

- Préparation des solutions (échantillons testés) : Dans un tube à essai, introduire 0,1 mL de la solution du produit à tester (agents actifs et supramolécules) et 0,9 mL de la solution de BSA à 5 %.
- Préparation des solutions (contrôle de la BSA) : Dans un tube à essai, introduire 0,1 mL d'eau distillée et 0,9 mL de la solution de BSA.

Après la préparation des solutions, les tubes sont placés dans un incubateur à 37 °C pendant 20 minutes, puis à 57 °C pendant 3 minutes pour induire la dénaturation de la BSA. Ensuite, on laisse les tubes refroidir à température ambiante, puis on ajoute 2,5 mL de solution tampon phosphate à chaque tube.

Enfin, les échantillons sont analysés par spectrophotométrie UV-Visible à $\lambda = 416 \text{ nm}$, et le pourcentage d'inhibition (%) de la dénaturation est calculé par l'équation suivante :

$$I\% = \left(\frac{AC - AT}{AC} \right) \times 100$$

AT : Absorbance de l'échantillon testé

AC : Absorbance de contrôle

II.7.3. *Test antioxydant :*

L'activité antioxydante d'un composé peut être évaluée in vitro à l'aide du test au radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle), une méthode simple, rapide et largement utilisée [9]. Ce test repose sur la réduction du radical libre stable DPPH• en présence d'un antioxydant. Cette réduction se manifeste par un changement de couleur, allant du violet foncé au jaune pâle, mesurable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm. La diminution de l'absorbance est proportionnelle à la capacité de l'échantillon à piéger les radicaux libres.

Dans cette expérience, une solution de DPPH (0,04mg/mL) est préparée dans du méthanol. Les échantillons à tester sont dilués à différentes concentrations. Un volume égal à 1 mL de la solution de DPPH est mélangé à 1 mL de chaque dilution d'échantillon, puis incubé à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante.

L'absorbance des mélanges est ensuite mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le pourcentage d'inhibition est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$I\% = [(AC - AT) / AC] \times 100$$

AC Absorbance de la solution contrôle (DPPH)

AT Absorbance de la solution test

Références partie expérimentale

1. Noreen, R., Zahir, F., Ullah, A., Khan, M. A., Rehman, A. U., & Sajid, M. (2021). Stability, pharmacokinetics and antibacterial evaluation of amoxicillin loaded chitosan nanoparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 47(3), 446–455.
2. Raynor, B. D. (1997). Penicillin and ampicillin. *Prim. Care Update OB/GYNS*, 4(4), 147–152.
3. Rafailidis, P. I., Ioannidou, E. N., & Falagas, M. E. (2007). Ampicillin/sulbactam: status in severe bacterial infections. *Drugs*, 67, 1829–1849.
4. Balderas, E., Ateaga-Tlecuitl, R., Rivera, M., Gomora, J. C., & Darszon, A. (2012). Niflumic acid blocks native and recombinant T-type channels. *J. Cell. Physiol.*, 227(6), 2542–2555.
5. Zielenkiewicz, W., Terekhova, I. V., Koźbiał, M., Wszelaka-Rylik, M., & Kumeev, R. S. (2008). Complexation of niflumic acid with native and hydroxypropylated α - and β -cyclodextrins in aqueous solution. *J. Phys. Org. Chem.*, 21(10), 859–866.
6. Balbi, H. J. (2004). Chloramphenicol: a review. *Pediatr. Rev.*, 25(8), 284–288.
7. Yea, S. D., & Kirana, E. (2005). *J. Supercrit. Fluids*, 34, 287–308.
8. Mishra, A., et al. (2023). In vitro anti-inflammatory activity of herbal extracts using protein denaturation assay. *J. Pharmacogn. Phytochem.*, 12(2), 317–321.
9. Khalid, S., et al. (2023). Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of natural plant extracts using DPPH and protein denaturation assays. *J. Adv. Res. Biochem. Pharmacol.*, 10(2), 55–63.



CHAPITRE III:
RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1. INTRODUCTION

Cette partie présente les principaux résultats obtenus au cours de notre étude, suivis de leur analyse et de leur interprétation. L'objectif est de mettre en évidence les éléments significatifs, de les confronter aux hypothèses de départ, et de les comparer aux données disponibles dans la littérature scientifique. Cette analyse critique permet de mieux comprendre les implications des résultats et de situer notre travail dans le contexte plus large de la recherche dans ce domaine.

III.2. CARACTERISATION DES SUPRAMOLECULES

III.2.1. Caractérisation UV-Visible :

Ce spectre UV-visible correspond vraisemblablement à l'amoxicilline dissoute dans le DMSO, et il présente des caractéristiques typiques des composés aromatiques et contenant des groupements conjugués. Un pic d'absorption intense apparaît autour de 275 nm, avec une absorbance maximale proche de 1,0. Ce pic est caractéristique des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ des doubles liaisons conjuguées, en particulier dans le noyau aromatique ou les groupements amides/conjugués présents dans l'amoxicilline.

Vu les spectres d'absorption d'ampicilline et du chloramphénicol classés en annexe, les mêmes remarques ont été notés ; pour le spectre d'absorption d'ampicilline dans le DMSO, le pic caractéristique des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ apparaît autour 272 et pour le chloramphénicol, le pic caractéristique des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ apparaît autour 279.

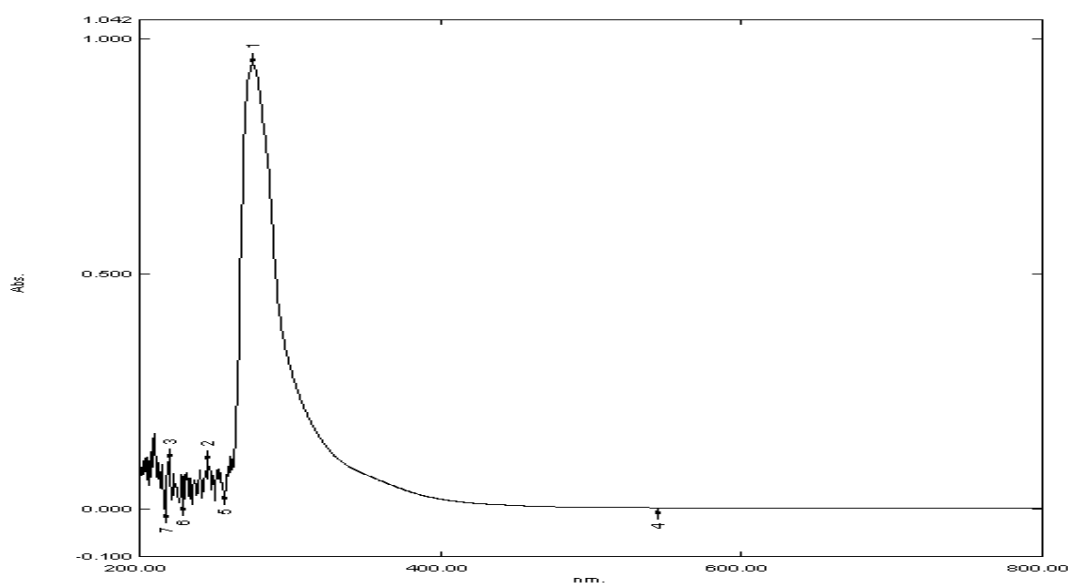


Figure III.1 : Spectre d'absorption de l'amoxicilline dans le DMSO.

Le spectre UV-visible présenté dans la figure III.2 correspond à l'acide niflumique dissoute dans le DMSO, il montre un pic principal très intense vers 290 nm ($\sim 3,0$ d'absorbance), Ce pic correspond à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ très intense dans le système aromatique conjugué notamment les noyaux pyridine ou benzène substitués de l'acide niflumique. Une bande plus large autour de 342 nm ($\sim 0,5-1,0$ d'absorbance), Elle peut être attribuée à des transitions $n \rightarrow \pi^*$ ou à une extension de conjugaison dans la molécule, comme entre le noyau aromatique et les groupements carboxyliques ou trifluorométhylés.

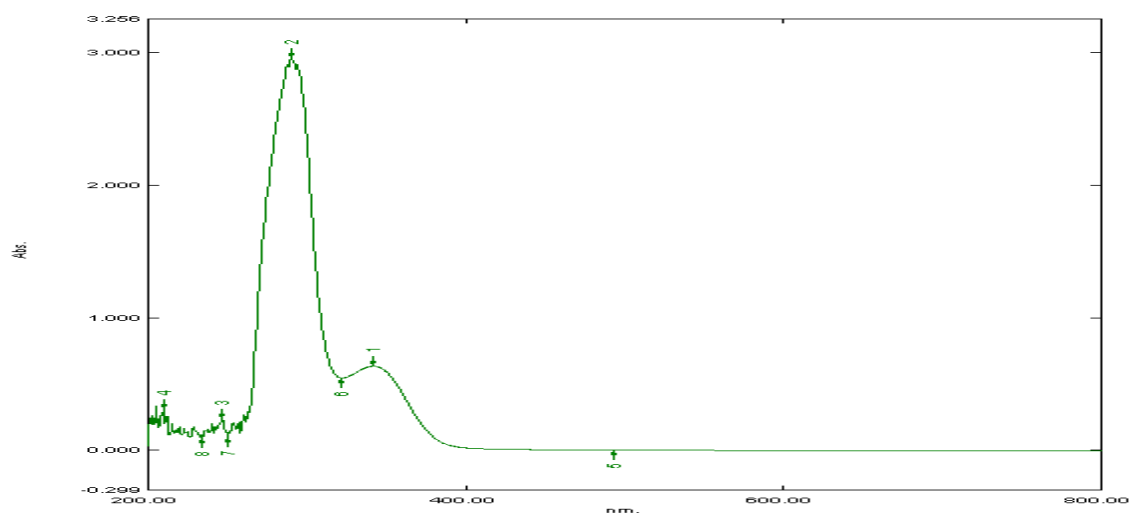


Figure III.2 : Spectre d'absorption de l'acide niflumique.

Dans la figure III.3, on présente le spectre d'absorption de S1, alors que le spectre d'absorption de S3 est classé en annexe, les deux spectres montrent clairement une bande intense d'absorption qui est différente des bandes initiales de chaque principe actif. A 274nm et 280 apparaissent les bandes caractéristiques du S1 et S3 respectivement. On distingue que la longueur d'onde du S1 se situe entre les deux longueurs d'onde des principes actifs, alors que la bande du S3 se déplace vers le rouge (effet bathochrome). On peut déduire qu'il y a une interaction entre les principes actifs utilisés.

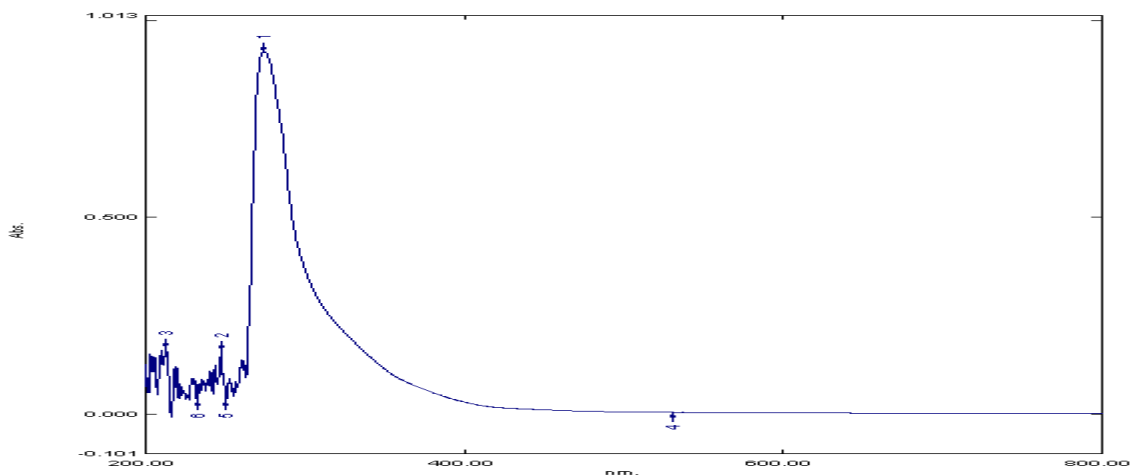


Figure III.3 : Spectre d'absorption de S1

Concernant la figure III.4, elle représente le spectre d'absorption de S2, elle indique une bande intense d'absorption à 289 nm et une autre plus large à 339 nm. La bande intense est positionnée entre les deux longueurs d'onde de principe actif, tandis que la bande large se déplace vers le bleu (effet hypsochrome), ce changement confirme l'interaction entre les principes actifs étudiés.

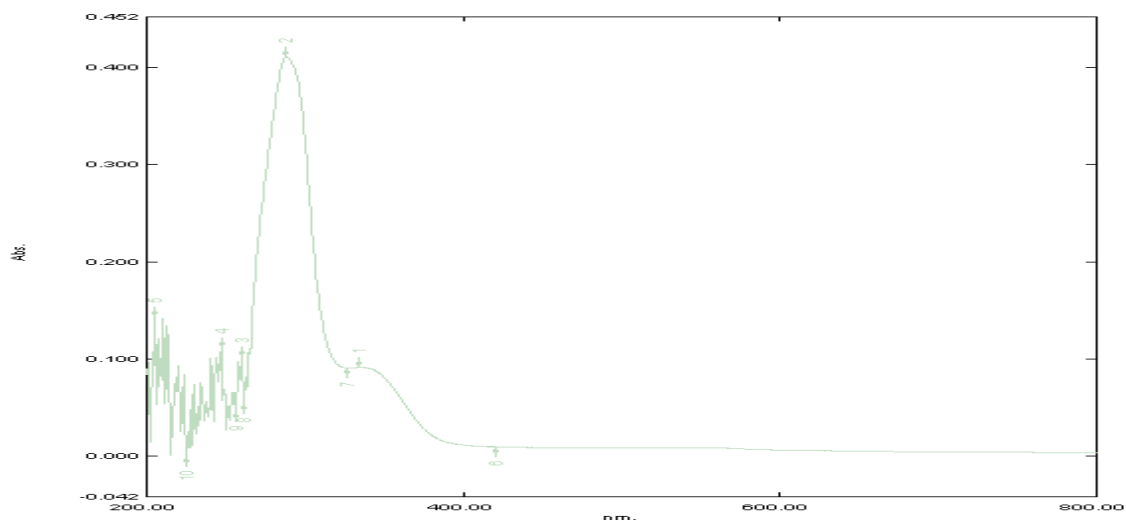


Figure III.4 : Spectre d'absorption de S2.

III.2.2. Test de solubilité :

On a effectué plusieurs tests de solubilité pour chaque produit afin de déterminer le meilleur solvant commun. Les résultats sont classés dans le tableau suivant :

Tableau III.1 : Résultats des tests de solubilité (++++ : soluble, ++ : peu soluble, ---- : insoluble)

Solvants produits	Acétone	Éthanol	Eau	Chloroforme	Dichlométhane	Diméthyl sulfoxyde
Amoxicilline	++	++	++++	----	++	++++
Ampicilline	++	++	++	++	++	++++
Acide niflumique	++++	++++	----	----	----	++++
Chloramphénicol	++++	++++	----	----	----	++++
S1 (AMO+AMP)	++	++	++	++	----	++++
S2 (AMO+AN)	++	++	++	----	----	++++
S3 (AMO+CAP)	++	++++	----	++++	----	++++

III.2.3. Spectre FTIR :

L'analyse FTIR a été utilisée pour caractériser et confirmer la présence d'interactions entre les constituants des supramolécules. La figure III.5 présente le spectre FTIR de l'amoxicilline, tandis que les spectres des autres principes actifs sont fournis en annexe. Le spectre montre des bandes fines, intenses et moyennement intenses, indiquant la présence de plusieurs groupements fonctionnels caractéristiques.

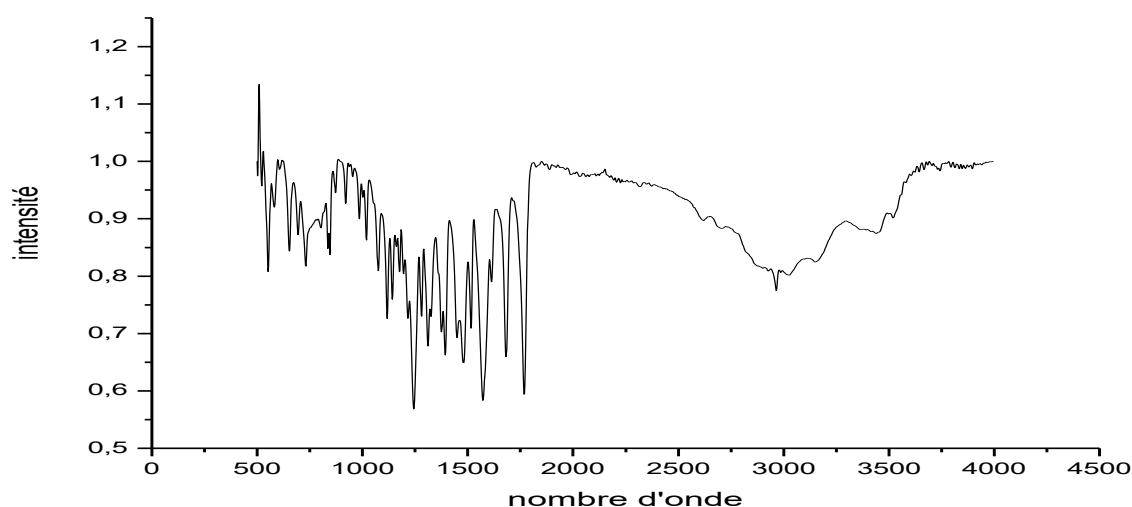


Figure III.5 : Spectre FTIR d'amoxicilline.

Tableau III.2 : Les bandes caractéristiques des principes actifs étudiés.

Molécules	Les bandes caractéristiques
Amoxicilline	<p>La déformation S-C apparaît à 2090cm^{-1} et les fonctions amines apparaissent à $3450\text{-}3500\text{cm}^{-1}$.</p> <p>Une bande intense apparaît à 1750cm^{-1}, correspondant à la vibration d'élongation du groupement C=O du cycle β-lactame et une bande située à 1690cm^{-1} attribuée à l'élongation du groupement amide (C=O).</p> <p>La présence du groupe amine primaire est confirmée par une bande à 1620cm^{-1}, correspondant à la vibration de déformation de la liaison N-H.</p> <p>Une bande moyennement intense entre 1600cm^{-1} sont associées aux vibrations de C-C aromatique,</p> <p>Une bande située à 1390cm^{-1} sont dues à la déformation symétrique du groupe méthyle (CH_3). La liaison C-N de l'amide apparaît à 1250cm^{-1},</p> <p>La bande apparaît à 1150cm^{-1} indiquent la présence de liaisons C-O, issue de la fonction alcool. Les bandes situées à 700 et 800cm^{-1} correspondent aux vibrations hors plan du cycle aromatique.</p>
Ampicilline	<p>La déformation S-C apparaît à 2085cm^{-1} et les fonctions amines apparaissent à $3450\text{-}3550\text{cm}^{-1}$. Une bande forte observée à 1750cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation du groupement carbonyle (C=O) du cycle β-lactame.</p> <p>Une bande bien définie à 1680cm^{-1} est attribuée au groupement amide (C=O) présent dans la chaîne latérale.</p> <p>La présence du groupe amine primaire confirmée par une bande de déformation N-H vers 1620cm^{-1}, accompagnée de vibrations associées autour de 3300cm^{-1}, dues aux liaisons N-H en élongation (souvent sous forme de double bande pour les amines primaires).</p> <p>Les vibrations de C-C aromatique située à 1600cm^{-1}.</p> <p>Une bande à 1320cm^{-1} correspond à la déformation du groupe méthyle (CH_3). Une bande située à 1260cm^{-1} est assignée à la vibration C-N de la liaison amide. Une bande à 1100cm^{-1} indique la vibration C-O, liée à la fonction alcool ou acide carboxylique.</p> <p>Des bandes dans la région $700\text{-}800\text{cm}^{-1}$ correspondent aux vibrations hors plan du noyau aromatique.</p>
Acide niflumique	<p>Une bande intense vers 1660cm^{-1} est attribuée à la vibration d'élongation du groupement carbonyle (C=O) de l'acide carboxylique.</p> <p>Des bandes situées entre 1600cm^{-1} correspondent aux vibrations du cycle aromatique</p> <p>Une bande à 3300cm^{-1} indique la présence de la liaison O-H acide.</p> <p>Une bande secondaire apparaît vers 1230cm^{-1} (liaison C-F) et des bandes apparaissent à 780 et 900cm^{-1}, attribuées aux vibrations hors plan des hydrogènes aromatiques.</p>
Chloramphénicol	<p>Une bande forte autour de 1680cm^{-1} est associée à la vibration d'élongation du groupement carbonyle (C=O) de l'amide.</p> <p>La liaison N-H de l'amide donne lieu à une bande large à 3200cm^{-1}. Le groupe hydroxyle (O-H) du chloramphénicol apparaît également sous forme de bande large dans cette même région.</p> <p>Des bandes vers 1600cm^{-1} correspondent aux vibrations du cycle aromatique, tandis qu'une bande nette à 1045cm^{-1} est attribuée aux vibrations C-O (alcool). Des bandes entre 800 et 900cm^{-1} traduisent les vibrations hors plan du cycle aromatique substitué.</p>

Dans la figure III.6, les spectres de supramolécule « amoxicilline-ampicilline » et mélange physique sont présentés, on observe qu'il existe une diminution totale de l'intensité des bandes caractéristiques et un léger décalage de la majorité des pics.

La formation d'une supramolécule modifie l'environnement chimique des groupements fonctionnels tels que la bande de nombre d'onde 3300 cm^{-1} qui correspond à la liaison OH, la bande de nombre d'onde de 1750 cm^{-1} qui correspond à la liaison C=O, les bandes de nombre d'onde 1550 cm^{-1} et 1500 cm^{-1} de la liaison C=O et C=C, la bande de 1260 cm^{-1} qui correspond à la liaison C-O et les bandes de nombre d'onde 1320 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} , 600 cm^{-1} qui correspondent respectivement à les liaisons C-O, C-N et C-H. Les décalages de ces bandes (surtout C=O, N-H, C-N) montrent clairement que les groupes fonctionnels actifs (COOH, NH_2 , amide) participent à des liaisons intermoléculaires dans la supramolécule. Ainsi, la région $1500\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ suggère une altération des groupes NH_2 et COOH de l'amoxicilline/ampicilline, ce qui est typique lors d'associations supramoléculaires. Ces modifications indiquent des interactions intermoléculaires (liaisons hydrogène, interactions $\pi\text{--}\pi$ ou ioniques).

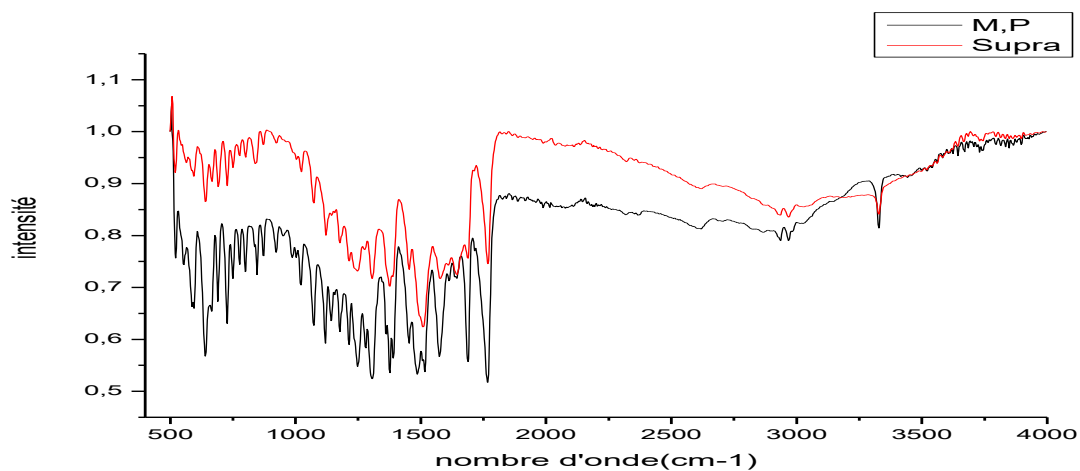


Figure III.6 : Spectre FTIR de supramolécule S1 (amo+amp) et mélange physique.

Les spectres FTIR de S2 « amoxicilline-acide niflumique » et le mélange physique sont présentés dans la figure III.7. Un changement notable dans l'intensité et l'emplacement des bandes caractéristiques. Un décalage de la bande carbonyle (C=O, 1660 cm^{-1}) est lié typiquement d'une formation de liaisons hydrogène, preuve d'un réseau supramoléculaire et un élargissement de la bande OH/NH qui est un marqueur fort d'interactions intermoléculaires. Les changements dans la zone $1000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ traduisent une réorganisation des liaisons C-N, C-

O, et aromatiques, probablement impliquées dans la structure de la supramolécule, on peut déduire que ces changements confirment que des liaisons sont produites entre les principes actifs étudiés.

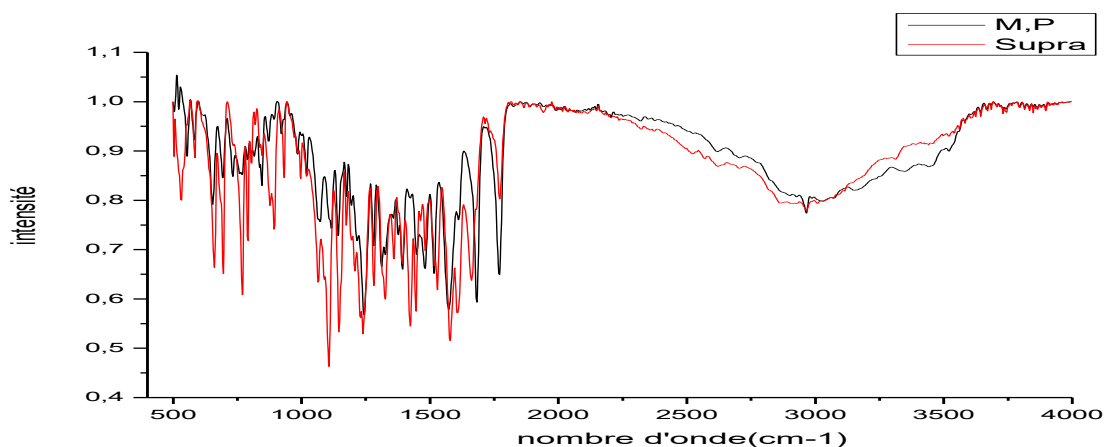


Figure III.7 : Spectre FTIR de S2 (AMO+AN) et le mélange physique

Les spectres de supramolécule S3 « amoxicilline-chloramphénicol » et de mélange physique sont présentés dans figure III.8, où ils démontrent des changements notables et variables dans l'intensité et les valeurs des bandes caractéristiques. Déplacement de la bande (C=O, 1700cm⁻¹) d'acide carboxylique et de la bande amide qui signifie la présence des liaison H avec NH₂ /OH. Ces interactions intermoléculaires réduit de la liberté de rotation aromatique et Réorganisation stérique locale, ces changements justifient la présence des interactions entre les principes actifs utilisés.

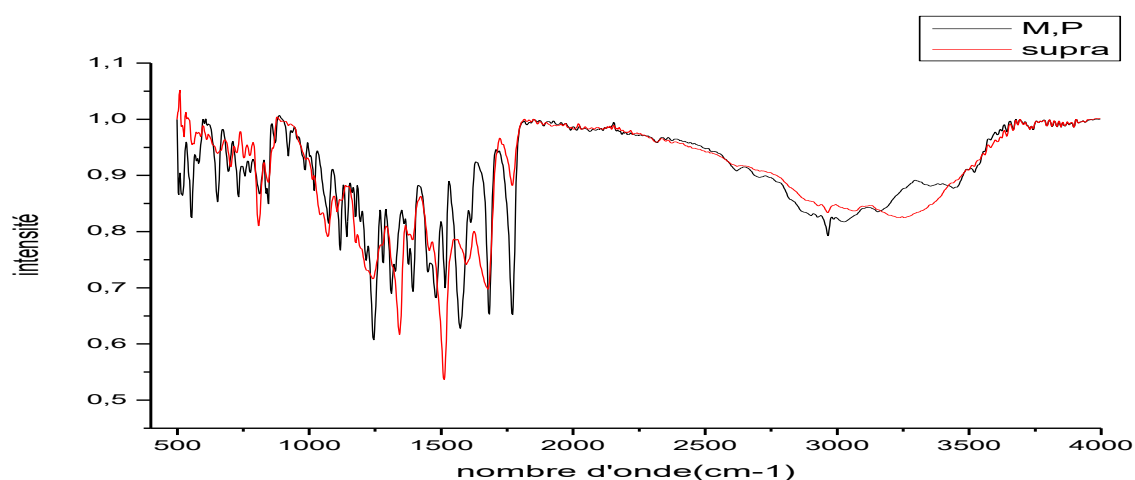


Figure III.8 : Spectres FTIR S3 (AMO+chloramphénicol) et le mélange physique

III.2.4. Spectre DRX :

Sur la figure III.9, on présente le diffractogramme d'amoxicilline, les autres diffractogrammes des principes actifs sont présentés en annexe. La structure cristalline des principes actifs étudiés est confirmée par la présence des pics intenses et fines qui apparaissent dans chaque diffractogramme. Ces pics sont bien identifiés et classés dans le tableau III.3 :

Tableau III.3 : Les pics caractéristiques en DRX des principes actifs étudiés

Code	2 θ °
AMO	2.22° ; 8.88° ; 10.55° ; 12.22° ; 14.44° ; 16.11° ; 17.22° ; 18.33° ; 19.44° ; 22.77° ; 23.33° ; 25.55° ; 26.55° ; 28.33° ; 29.44° ; 31.66° ; 32.77°.
AMP	8.18° ; 14.09° ; 14.54° ; 15.45° ; 16.36° ; 16.81° ; 20° ; 21.36° ; 22.27° ; 22.72° ; 25.45° ; 28.63° ; 29.54° ; 32.27° ; 34.09° ; 39.09°.
AN	7.72° ; 11.36° ; 12.95° ; 16.36° ; 20.90° ; 21.36° ; 23.18° ; 23.63° ; 24.77° ; 25.90° ; 28.63° ; 36.81°.
CA	2.27° ; 7.72° ; 10.90° ; 11.81° ; 12.27° ; 14.09° ; 15.90° ; 17.72° ; 19.09° ; 20° ; 20.45° ; 20.90° ; 22.27° ; 24.09° ; 26.36° ; 27.72° ; 28.63° ; 30.45° ; 31.81° ; 33.18° ; 40.45° ; 41.81°.

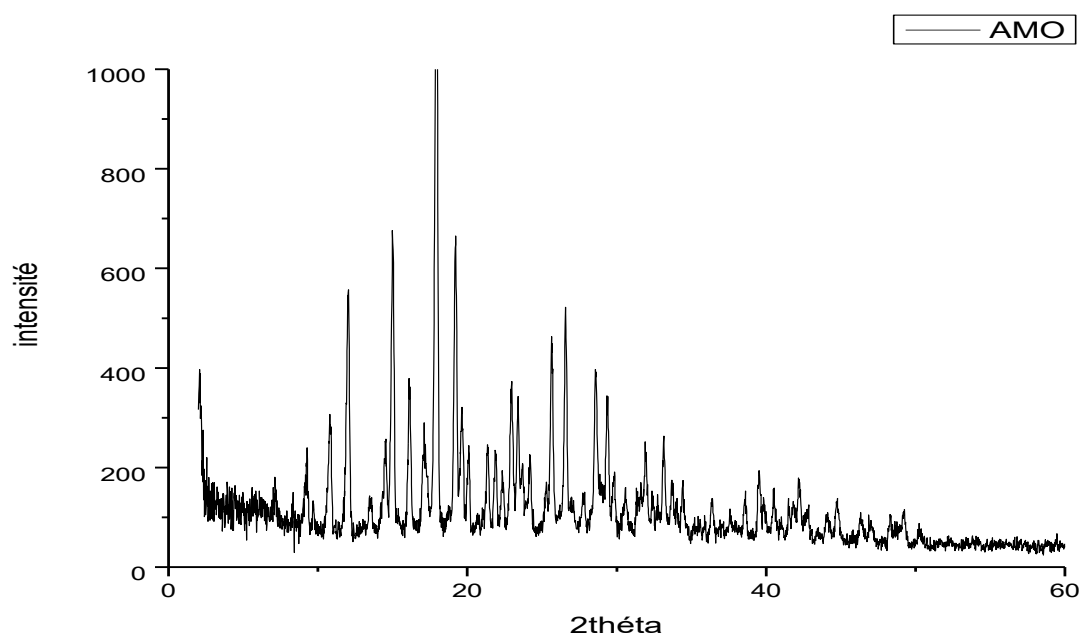


Figure III.9 : Le diffractogramme d'amoxicilline

Dans la figure III.10, les diffractogrammes du mélange physique et S1 sont présentés, ils ont été analysés et comparés. Des changements remarquables ont été notés dans la forme des pics caractéristiques tels que la diminution majoritaire des intensités et l'augmentation d'un pic d'amoxicilline ($2\theta = 16.11^\circ$). Ces changements confirment la présence d'interaction entre les principes actifs utilisés.

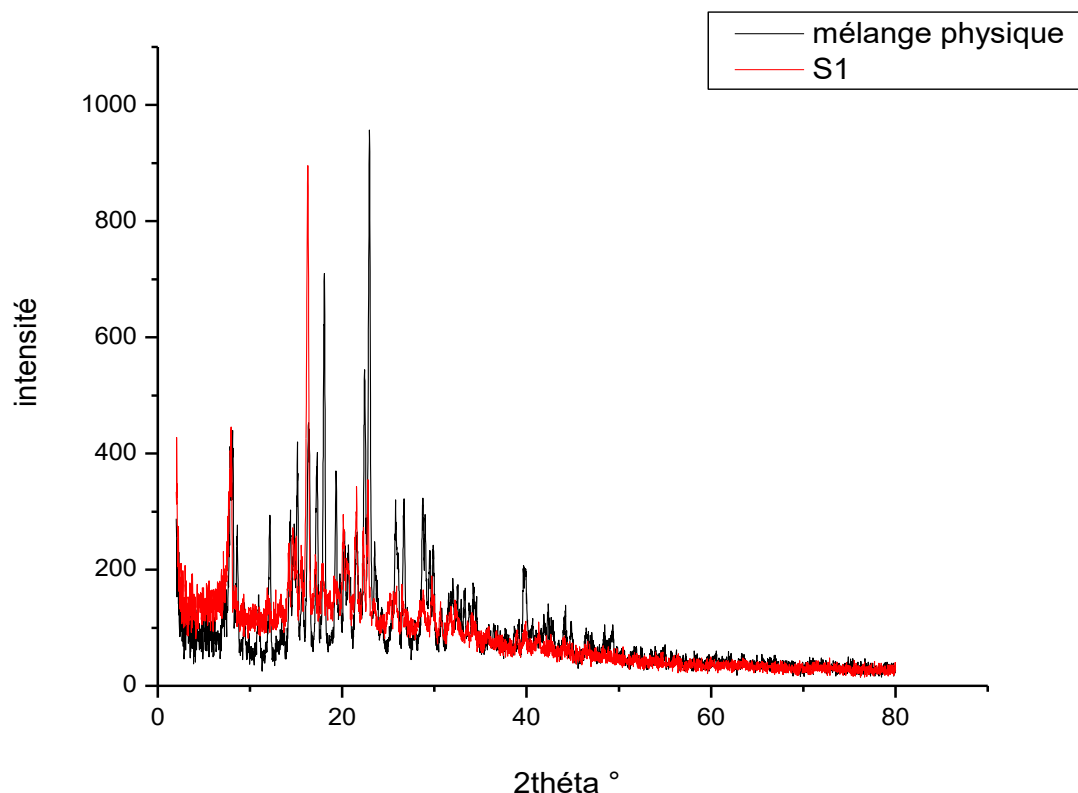


Figure III.10 : Diffractogramme de mélange physique (AMO+AMP) et de S1

La figure III.11 montre deux diffractogrammes, celui du mélange physique (amoxicilline + acide niflumique) et du S2, on observe une diminution d'intensité de la majorité des pics tels que ceux d'acide niflumique ($2\theta = 7.72^\circ$; 23.63°) et ceux d'amoxicilline ($2\theta = 14.44^\circ$; 16.11°). Cette diminution signifie l'existence d'interaction entre les principes actifs.

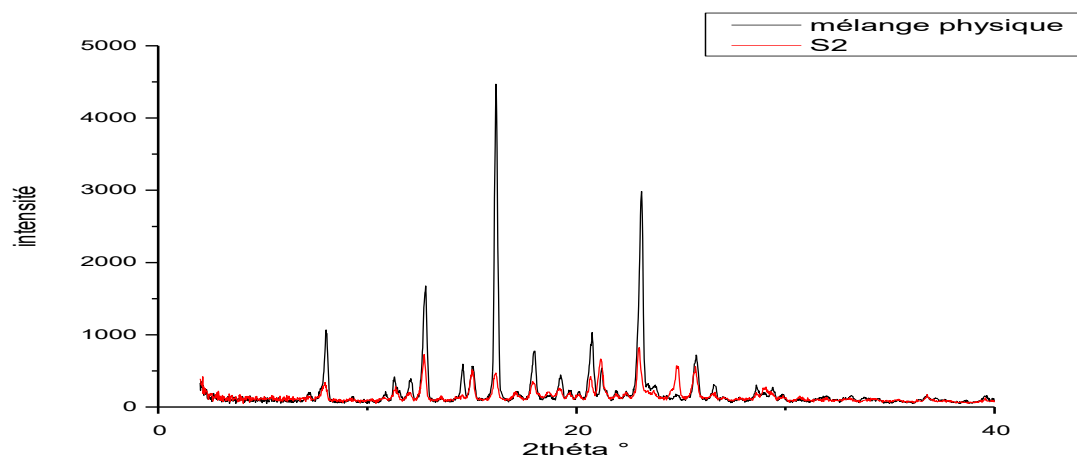


Figure III.11 : Diffractogramme de mélange physique (AMO+AN) et de S2

Les diffractogramme du mélange physique (Amoxicilline+Chloramphénicol) présente une structure cristalline caractérisé par les pics intenses et fines alors que le S3 montre une structure amorphe confirmant toujours l'interaction entre les deux principes actifs (figure III.12).

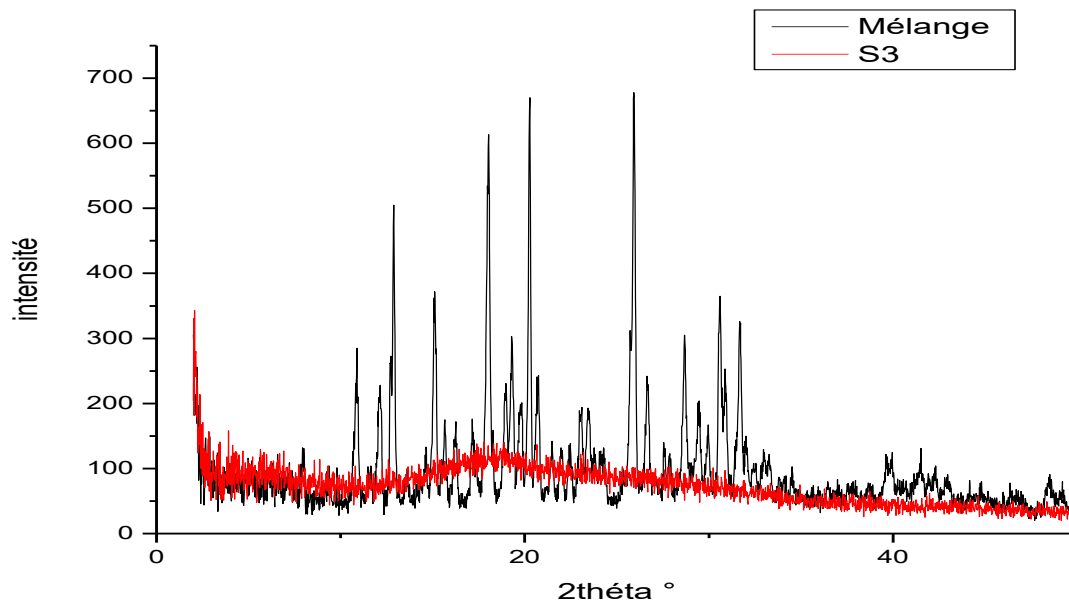


Figure III.12 : Diffractogramme de mélange physique (AMO+CA) et de S3.

III.3. CARACTERISATION DES MICROSPHERES

Les microsphères préparées sont soumises à plusieurs méthodes de caractérisation afin de déterminer le taux d'encapsulation, la morphologie et les diamètres.

III.3.1. Taux d'encapsulation et distribution des tailles :

L'évaluation des diamètres des microparticules s'est faite grâce à la méthode classique qui utilise le microscope optique, de ce fait qu'en s'établissant sur les équations présentées au chapitre II. Au départ, nous avons effectué un dénombrement des particules pour chaque échantillon et les données recueillies ont été organisées dans une feuille de calcul Excel. Un exemple de calcul a été donné dans le tableau suivant, et l'autre tableau est classé dans l'annexe.

Dans la formulation, on a utilisé les mêmes conditions opératoires pour les deux préparations donc les deux distributions des tailles sont presque identiques. On note aussi que les systèmes obtenus sont polydispersés du fait que les valeurs de dispersions sont loin de 1. Cette dispersion est confirmée par la forme des courbes de distribution qui ne sont pas superposés. En vue des résultats de rendement classés dans le tableau, on obtient des valeurs importantes qui dépassent les 50%. Ces résultats sont cohérents avec la littérature qui cite que l'éthylcellulose donne lieu à un rendement élevé lors l'encapsulation par évaporation de solvant [1].

Tableau III.4 : Taux d'encapsulation et distribution des tailles

Code		Rdt%	Taux d'encapsulation %	d ₁₀ (µm)	d ₃₂ (µm)	d ₄₃ (µm)	Dispersion
MS1	/	66,22	21,85	148	266	294	1.98
MS2	AMO	52,81	8,450	148	265	290	1.96
	AMP	71,35	11,42				

Tableau III.5 : Résultats granulométriques des microsphères Amoxicilline.

Classe I	Centre de classe di((μm))	Effectif ni	ni*di	Fréquence en nombre%	ni*di ²	Fréquence en surface%	ni*di ³	Fréquence en masse%	ni*di ⁴
0-100	50	106	5300	42,57	2,65E+5	3,29	1,325E+7	0,62	6625000
100-200	150	71	10650	28,51	1,5975E+6	19,86	2,39625E+8	11,19	3,594375E+10
200-300	250	44	11000	17,67	2,75E+6	34,19	6,875E+8	32,11	17,1875E+10
300-400	350	28	9800	11,24	3,43E+6	42,65	12,005E+8	56,08	42,0175E+10
	Somme	249	36750	100	8,0425E+6	100	21,40875E+8	100	62,8656E+10

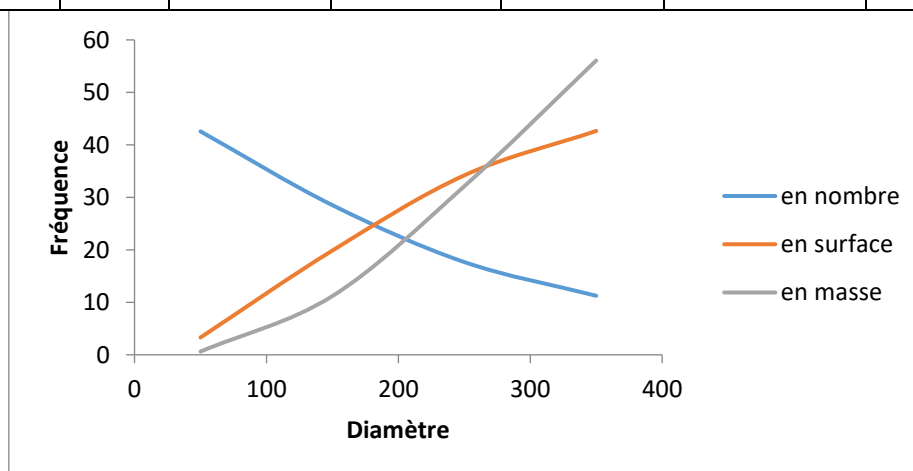


Figure III.13 : Courbes de distribution des tailles de MS1

III.3.2. Caractérisation par MEB :

Les particules préparées sont soumises à une caractérisation par Microscope Electronique à Balayage au niveau du CRAPC Laghouat, les images obtenues montrent des formes irrégulières avec une surface poreuse. Pour les particules chargées d'AMO (MS1) une surface lisse est notée, alors que pour les MS2 une surface légèrement ridée, cela peut être justifiée principalement par le seul paramètre changé qui est l'agent encapsulé, qui fait augmenter la

viscosité de la phase organique et il est connu que c'est un paramètre important circonvenant la morphologie des microparticules [2].

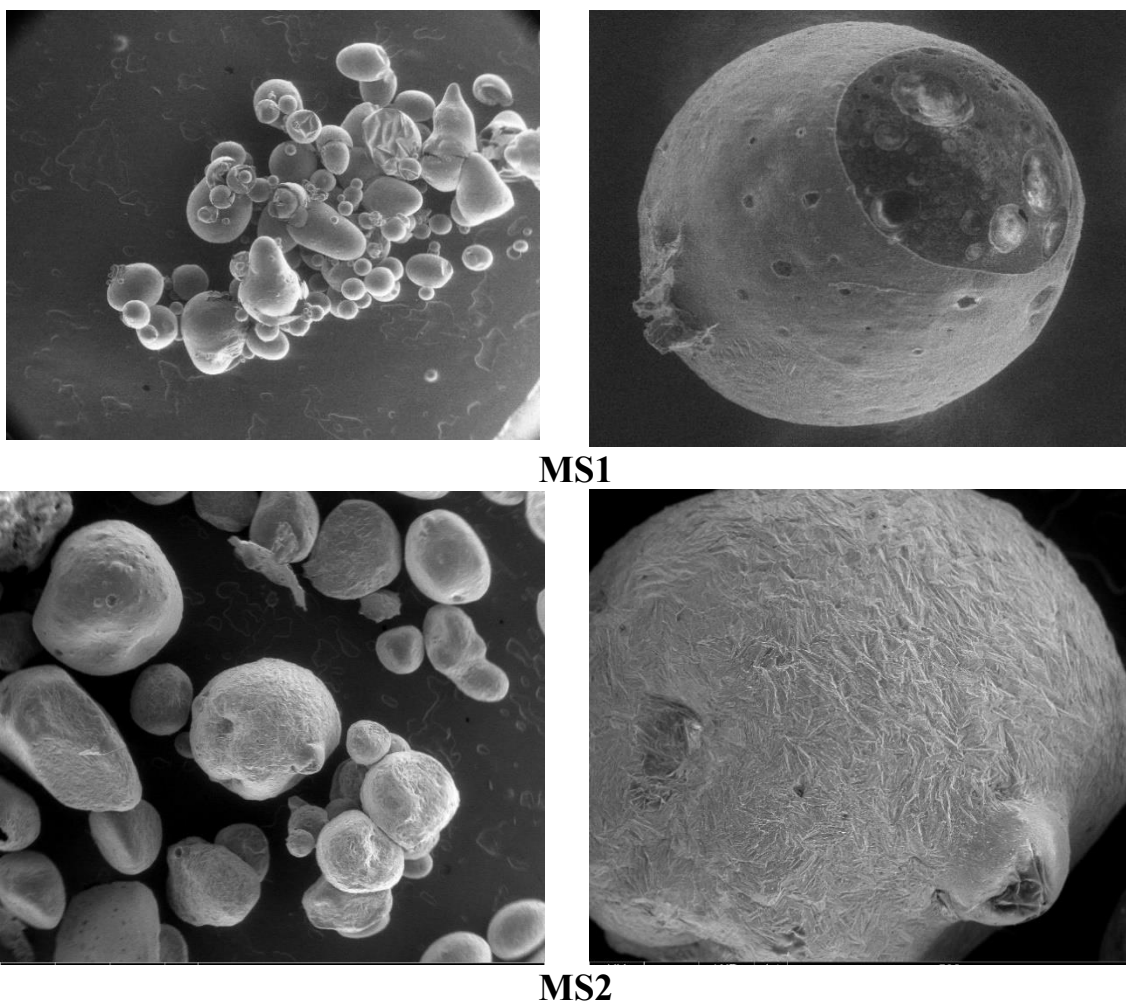


Figure III.14 : Images MEB des MS1 et MS2

III.3.3. Caractérisation par FTIR :

Les principales bandes observées dans le spectre infrarouge de l'éthylcellulose, selon Mouffok et al sont les suivant [3] :

- 3470 cm^{-1} : bande large due à la vibration d'élongation de la liaison **O-H**, attribuée aux hydroxyles résiduels présents dans la structure.
- 2970 cm^{-1} : bande d'élongation des liaisons **C-H** aliphatiques (groupes méthyle et méthylène).
- 1375 cm^{-1} : bande associée à la déformation symétrique du **groupe CH₃**.
- $1110\text{--}1050 \text{ cm}^{-1}$: bande intense caractéristique des vibrations de la liaison **C-O-C**, propre aux fonctions éther présentes dans la chaîne principale de l'éthylcellulose.

Le spectre FTIR des microsphères (MS1) a été comparé avec les spectres FTIR d'Ethylcellulose et d'amoxicilline pure. Nous identifions une forte diminution de l'intensité de bandes caractéristiques d'amoxicilline justifiée par l'enrobage de la matrice autour de l'agent actif et est confirmé par la présence des bandes FTIR significatives d'AMO dans le spectre des microsphères aux longueurs d'ondes suivantes : La bande aromatique N—C apparaît à 1250 cm^{-1} , La vibration C=O apparaît à 1750 cm^{-1} , La déformation S-C apparaît à 2090 cm^{-1} et les fonctions amines apparaissent à $3450\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$.

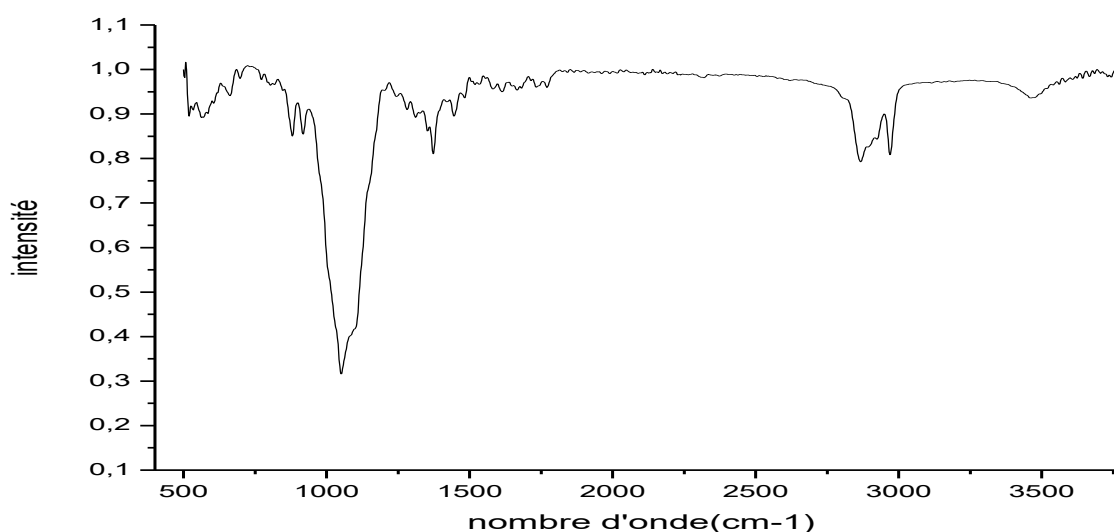


Figure III.15 : Spectres FTIR de microsphère MS1.

Le spectre FTIR des microsphères (MS2) présenté dans la figure III.16 apparaît comme la sommation des spectres FTIR de la supramolécule S1 et d'éthylcellulose, alors cette analyse confirme la présence de S1 dans les microsphères, en tirant les bandes caractéristiques suivantes :

Les bandes caractéristiques dont les valeurs 1125 cm^{-1} , 1275 cm^{-1} correspondent au C—N, C—O.

Les liaisons S-C et la fonction alcool apparaissent respectivement à 2825 cm^{-1} et 3000 cm^{-1} .

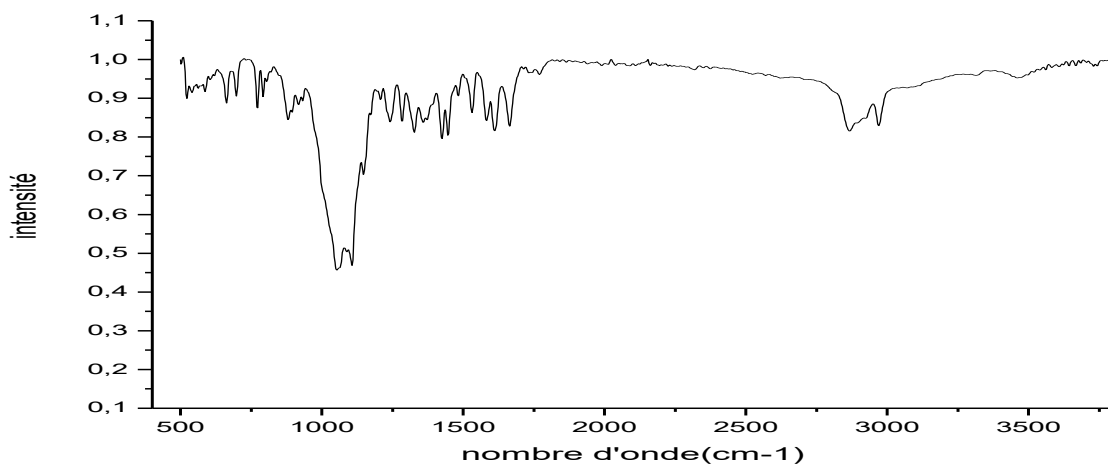


Figure III.16 : Spectre FTIR des microsphères MS2

III.3.4. Caractérisation par DRX :

La figure III.17 représente des diffractogramme de l'amoxicilline, de l'éthyle cellulose et du MS1. On trouve que la structure est cristalline pour l'amoxicilline, semi-cristalline pour l'éthylcellulose, et amorphe pour les microsphères préparées. On peut déduire que la microencapsulation se fait avec succès et que l'amoxicilline est placé dans la partie amorphe du polymère lors de l'encapsulation [4].

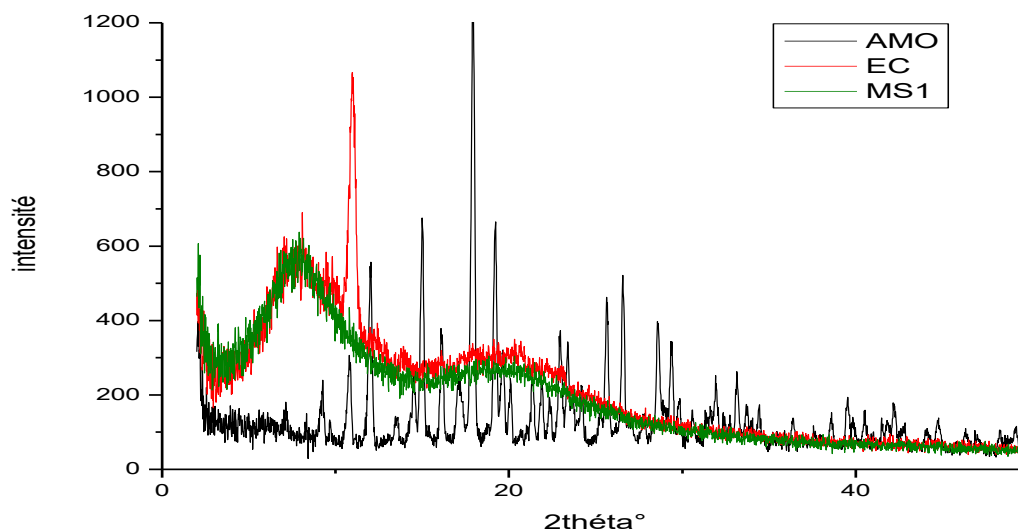


Figure III.17: Les diffractogrammes d'AMO, EC et MS1

Concernant la figure III.18 qui présente les diffractogrammes du S1, EC et MS2, on note que S1 a une structure cristalline, EC a une forme semi-cristalline et les microsphères ont une structure amorphe confirme la même hypothèse d'inclusion.

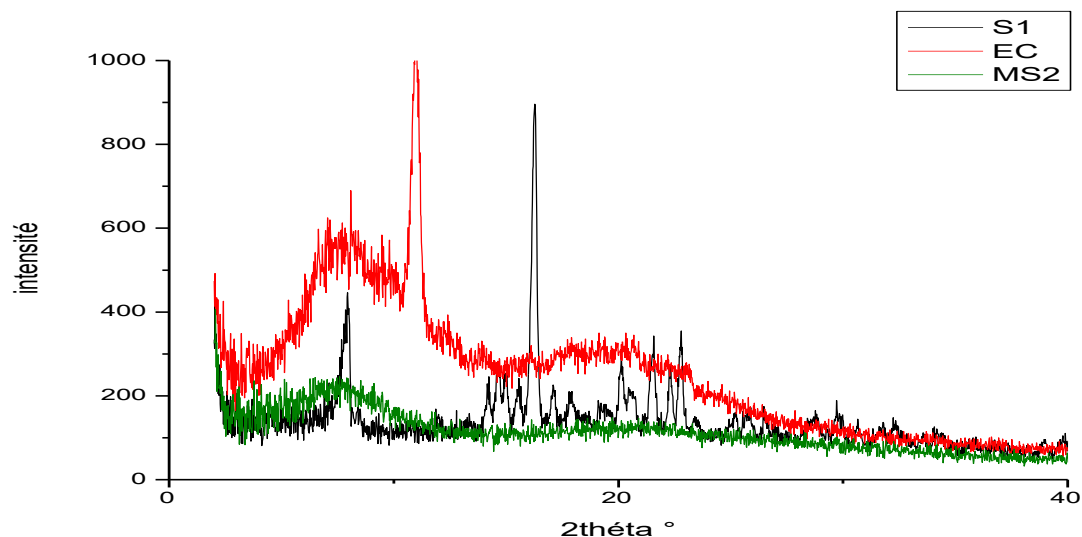


Figure III.18: Les diffractogrammes du S1, EC et MS2

III.4. ETUDE CINETIQUE

On a réalisé les cinétiques de libération pour les deux microsphères MS1 et MS2 dans le pH=1,2. les courbes de libération obtenues sont présentées dans les figures III.19 et III.20 :

Pour les microparticules MS1, le taux de libération atteint les 50% après 200 min de libération, on note que la cinétique est rapide au premier temps puis elle se ralentit jusqu'à 500min et probablement elle forme un palier de libération dans le reste du temps.

En ce qui concerne MS2, le mécanisme de libération forme un premier stade caractérisé par une libération significative jusqu'à 500min, suivis probablement par une stabilisation de taux libéré jusqu'à la fin de la cinétique. Dans cette formulation, On remarque que l'AMO présente un pourcentage de libération élevé par rapport à l'AMP lors de la cinétique, cela peut être justifié par le rendement d'encapsulation.

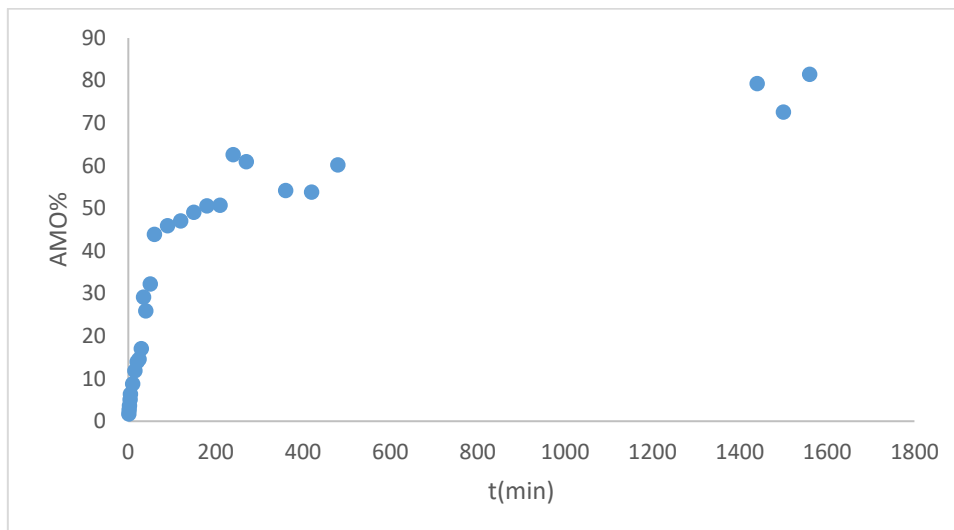


Figure III.19 : Pourcentage d’AMO libéré en fonction du temps à partir des microsphères dans un PH =1,2 et T= 37°C

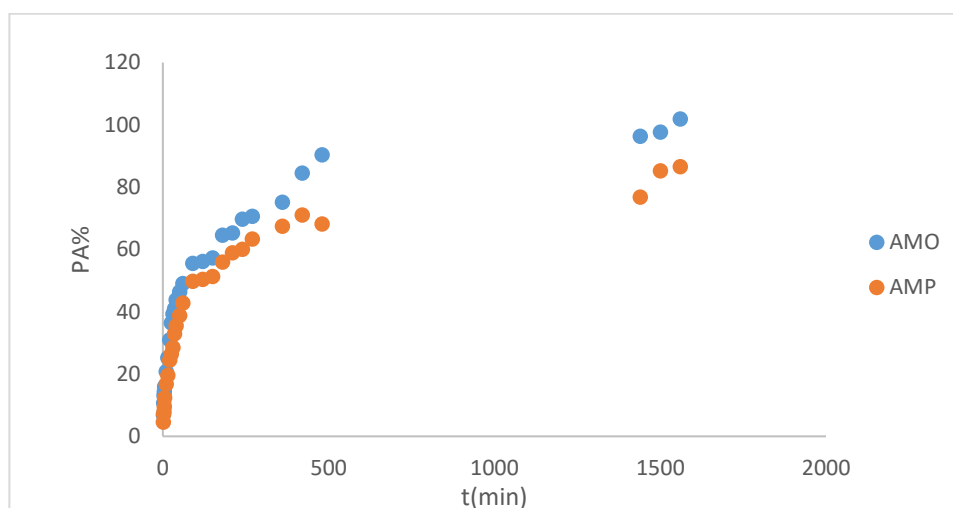


Figure III.20 : Pourcentage d’AMO et AMP libéré en fonction du temps à partir des microsphères dans un PH =1,2 et T= 37°C

Nous tentons d'assigner un ordre de réaction à nos cinétiques. Pour commencer, on évalue les ordres de réaction classiques 0, 1 et 2. Les images suivantes III.21, III.22 et III.23 illustrent les courbes associées. Aucune linéarité n'est obtenue, c'est pourquoi nous avons opté pour une modélisation basée sur l'équation d'Higuchi suivante.

$$Q = K_H t^{1/2}$$

Q : quantité de matière libéré (dans notre cas pourcentage)

K_H : constante de vitesse selon la loi d’Higuchi

$t^{1/2}$: racine de t

Traçant le pourcentage de libération en fonction de la racine de t , la cinétique de libération est linéaire au premier temps. Les résultats obtenus sont présentés dans les figure III.24 et III.25. On peut déduire que le système de libération est régi par la diffusion ce qui déroule par la pénétration du liquide à l'intérieur de la particule, solubilisation du principe actif et sa diffusion vers le milieu extérieur.

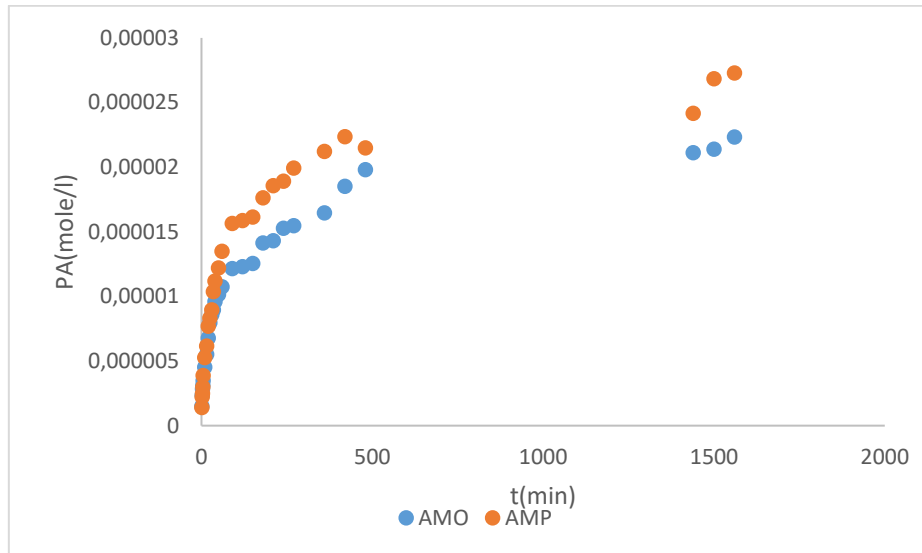


Figure III.21: Le pourcentage libéré en fonction du temps (ordre 0) pour MS2.

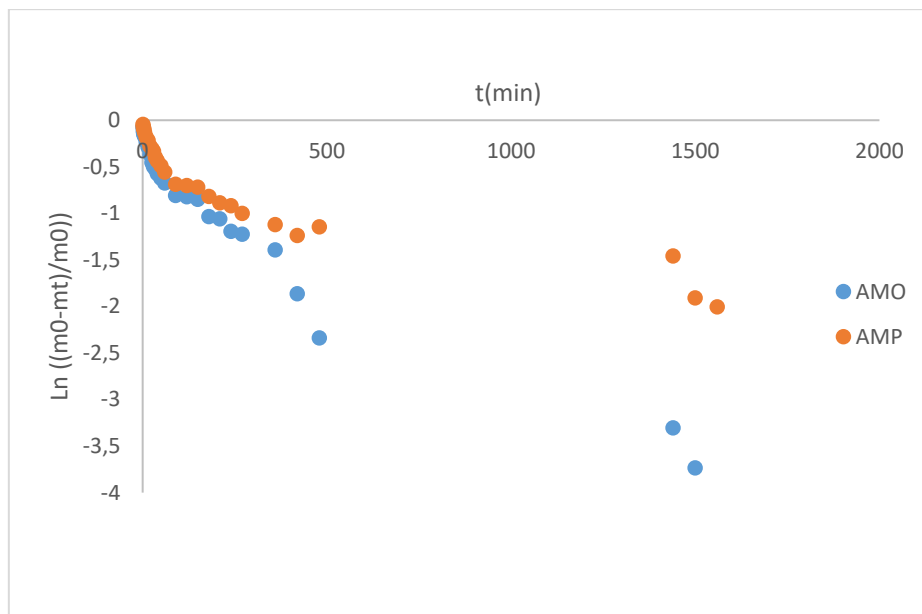


Figure III.22 : $\text{Ln}[(m_0-m_t)/m_0]$ en fonction du temps (ordre 1) pour MS2.

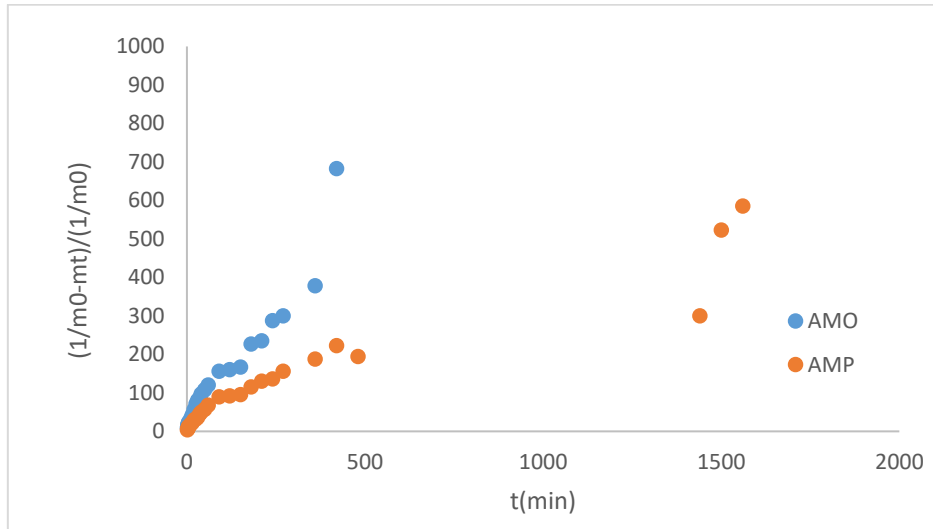


Figure III.23 : $(1/m_0 - m_t)/(1/m_0)$ en fonction du temps (ordre 2) pour MS2

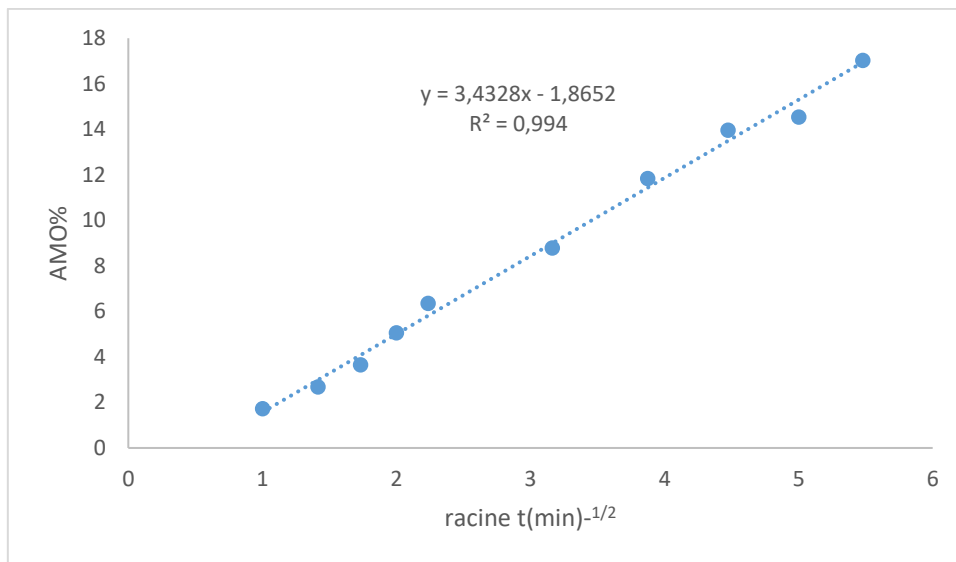


Figure III.24 : Pourcentage libéré en fonction de la racine carrée du temps pour MS1.

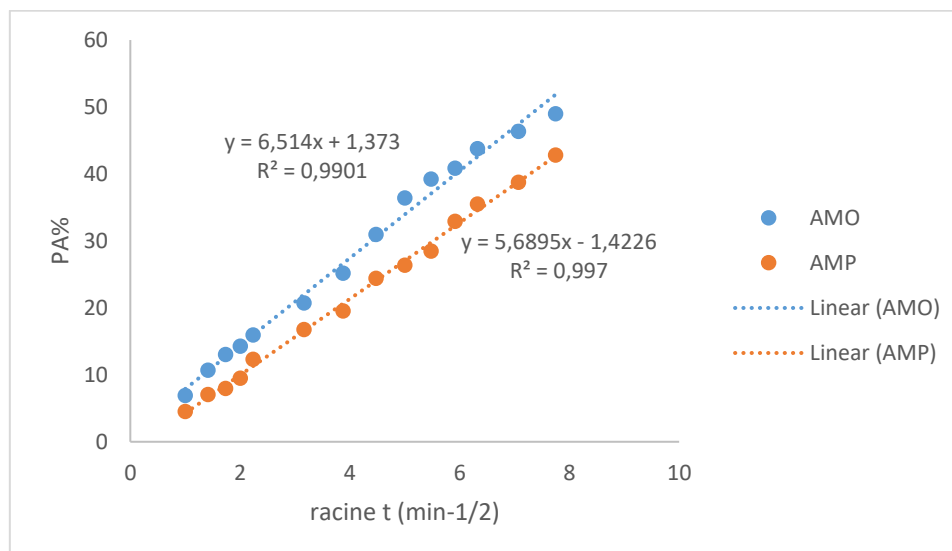


Figure III.25 : Le pourcentage libéré en fonction de la racine carrée du temps à partir des MS2.

Il est observé que les équations établies, exprimant la quantité de matière en fonction de la racine carrée du temps (équation d'Higuchi), prennent la forme :

$$Q = K t^{1/2} \pm C.$$

Ce coefficient C est expliqué par l'effet Brust, qui aborde le phénomène de libération initiale et établit un lien entre sa valeur, la morphologie et la position du principe actif au sein de la microparticule examinée [5].

-C : Cela indique que le principe actif se trouve à l'intérieur des microparticules.
 +C : indique qu'un certain pourcentage du principe actif se trouve à la surface des microparticules.

D'après nos observations, les microparticules MS1 élaborées renferment amoxicilline sur leurs surfaces tandis ce qu'il est bien enrobé dans MS2.

Tableau III.6 : Les constantes de vitesse selon la loi d'Higuchi et les coefficients de corrélation pour les deux microsphères.

Code		K_H	R^2
MS1		3,4328	0,994
MS2	AMO	6,514	0,9901
	AMP	5,6895	0,997

III.5. RESULTATS DES TESTS BIOLOGIQUES

III.5.1. Test antibiotique :

Ce test nous a permis de mesurer l'activité antibactérienne de nos produits initiaux et des produits élaborés selon la méthode de diffusion en milieu solide. Des zones d'inhibition nettes autour des disques déposés témoignent de l'activité antibactérienne. Des images explicatives sont présentées dans les figures III.26 III.27. Les autres images sont rangées en annexe. Les histogrammes III.28, III.29 résument les diamètres d'inhibition obtenus lors du test.

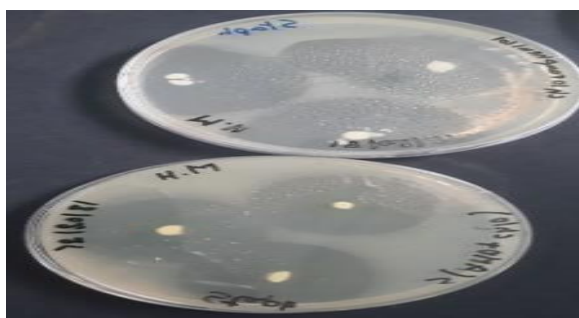


Figure III.26 : Résultats de l'inhibition de la souche *Staphylococcus* par CA et S3.

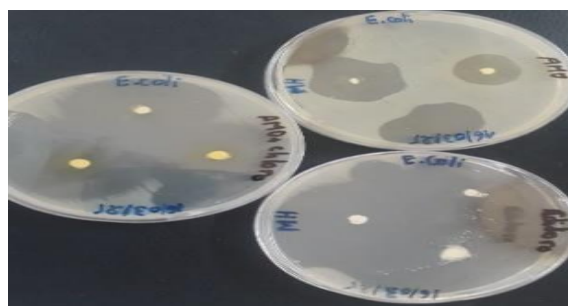


Figure III.27 : Résultats de l'inhibition de la souche *E. Coli* par AMO, CA et S3.

Pour les souches testées, on note que le chloramphénicol présente un diamètre d'inhibition important que celles des deux bêtalactamines utilisés (l'amoxicilline et ampicilline) qui présente des diamètres presque identiques par contre le diamètre obtenu pour l'acide niflumique est faible.

Pour le *staphylocoque*, les produits testés présentent une activité variable vis-à-vis cette souche. On trouve que l'amoxicilline et l'ampicilline présentent diamètre d'inhibition d'ordre de 25 mm, alors que le diamètre du S1 est inférieur à ceux des agents actifs, signifie par un effet antagoniste vis-à-vis cette souche.

Pour l'éthylcellulose, aucune activité est notée, et les particules MS1 et MS2 présentent des diamètres d'inhibition très faible, cela est justifié par l'effet de la matrice qui empêche la dissolution de l'agent actif dans le milieu solide.

Dans la figure III.29 l'histogramme démontre les diamètres d'inhibition des produits utilisés vis-à-vis l'*E. Coli*. On trouve que l'amoxicilline présente un diamètre de 29 mm et l'ampicilline à 36 mm et note que S1 montré une zone d'inhibition de diamètre 43 mm ce qui nous a permis de dire que le supramolécule a améliorée l'activité antibactérienne (effet auditif),

alors que le S2 et S3 présente un effet antagoniste. MS1 et MS2 présente des diamètres qui ne dépassent pas 5mm due probablement à l'EC qui montre une inhibe la diffusion de l'agent actif dans la gélose.

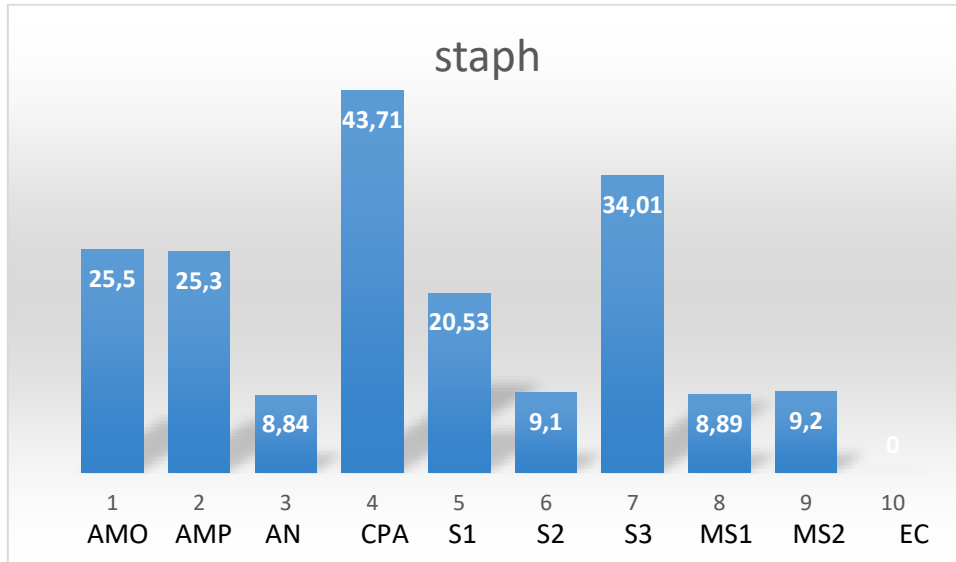


Figure III.28 : Représentation des diamètres d'inhibition des tests bactériologiques.

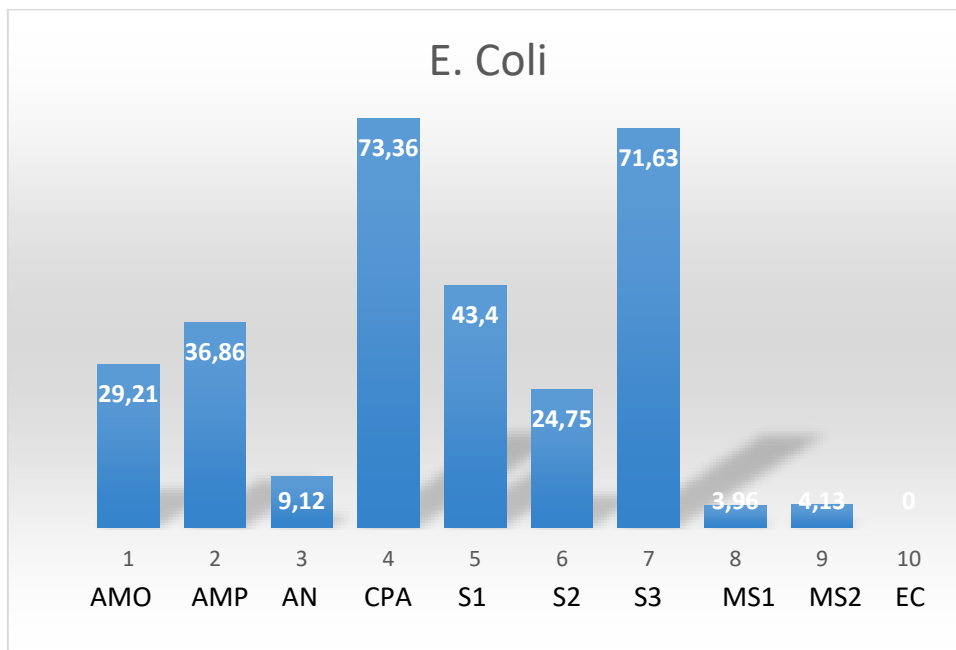


Figure III.29 : Représentation des diamètres d'inhibition des tests bactériologiques

III.5.2. Test anti-inflammatoire :

Dans le but d'examiner l'effet anti-inflammatoire de nos produits, nous avons effectué un test *in vitro* visant à inhiber la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure III.30 sous forme des histogrammes.

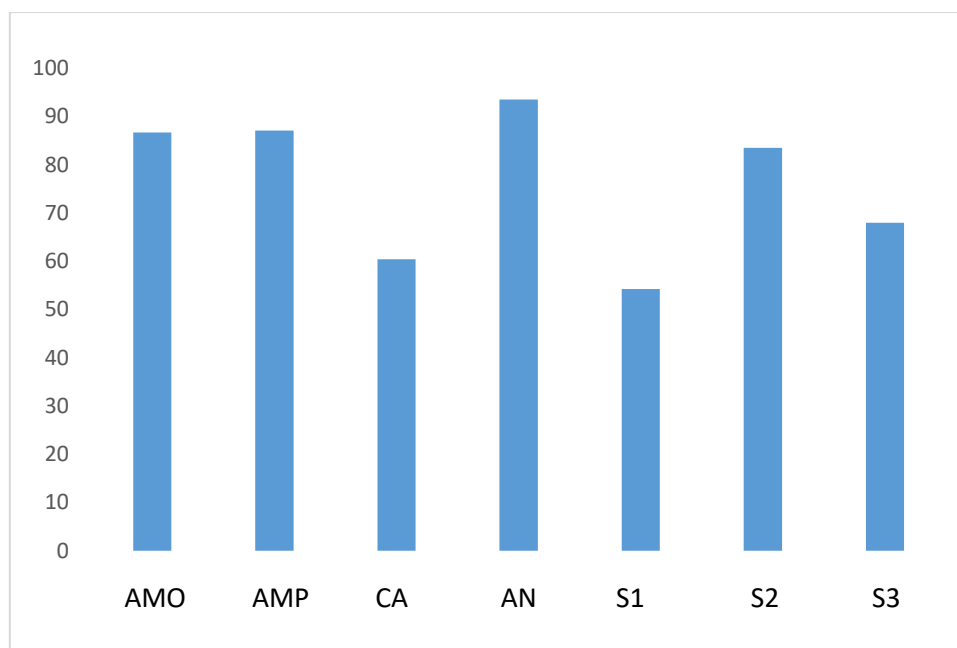


Figure III.30 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA) par les différents composés.

Les deux composés pris individuellement ont démontré une activité anti-inflammatoire significative, corrélée à une forte interaction avec la BSA, suggérant une bonne biodisponibilité et une interaction efficace avec les cibles biologiques de l'inflammation. En revanche, la supramolécule issue de l'assemblage de ces deux entités a présenté une activité nettement réduite. Ce résultat peut s'expliquer par plusieurs hypothèses :

- Un masquage partiel ou total des groupes fonctionnels actifs au sein de l'architecture supramoléculaire, limitant leur accessibilité ;
- Une diminution de l'affinité de la supramolécule pour la BSA, traduisant une altération de la distribution ou de la solubilité ;
- Une conformation rigide ou inappropriée de la structure assemblée, défavorable aux interactions avec les cibles biologiques ;
- Un effet antagoniste entre les composants au sein de la supramolécule.

Ces observations suggèrent que l'organisation supramoléculaire, bien que potentiellement avantageuse pour d'autres propriétés (stabilité, vectorisation, etc.), peut compromettre l'efficacité pharmacologique en masquant les sites actifs ou en modifiant les interactions biomoléculaires essentielles.

III.5.3. Test antioxydant :

Le test DPPH permet de déterminer la capacité antioxydante de nos produits synthétisés par le changement de couleur (violet vers le jaune pâle).

Les figures III.31, III.32 représentent les résultats de tests antioxydants sur les produits de départ et les produits préparés. On observe qu'ils n'y pas de changement de couleurs des solutions des principes actifs quand on ajoute la solution de DPPH ; par contre, on a un changement de couleurs pour les supramolécules qui indique la présence de leur pouvoir antioxydant.

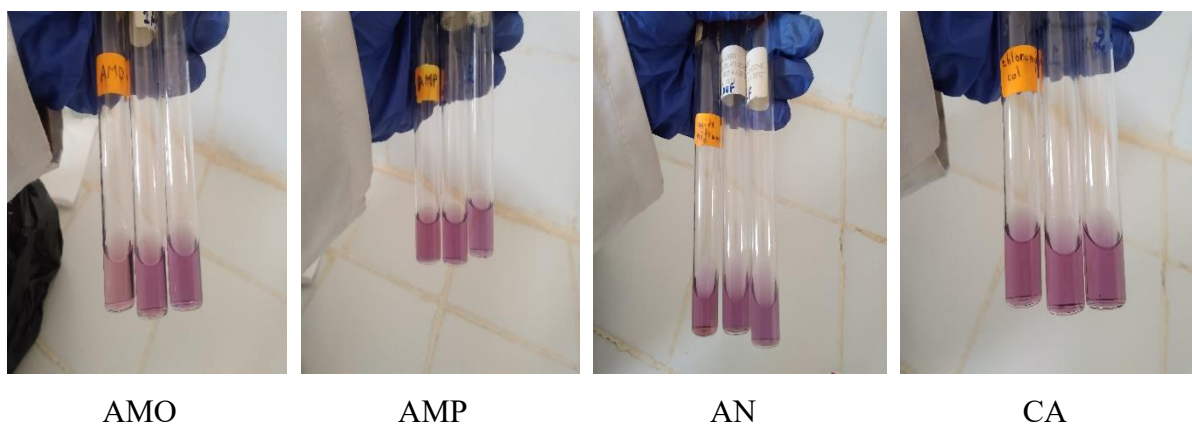


Figure III.31 : Les résultat de test antioxydant sur les principes actifs



Figure III.32: Les résultats de test antioxydant sur les supramolécules

Les supramolécules exhibent une activité antioxydante, et le calcul de la concentration inhibitrice médiane (CI50), qui est un paramètre essentiel afin d'évaluer l'efficacité à bloquer l'oxydation de la solution DPPH à une concentration donnée. Ce facteur est extrait par l'équation de graphe de la variation de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration de substance antioxydante (Figure III.33 de S1 les autres graphes sont classés dans l'annexe). Les calculs sont résumés dans le tableau III.7.

Le pourcentage d'inhibition est mesuré par la loi suivant [6] :

$$I\% = [(AC - AT) / AC] \times 100$$

AC : Absorbance du contrôle (Abs de solution blanc)

AT : Absorbance des tests effectués. (Abs des solutions préparer)

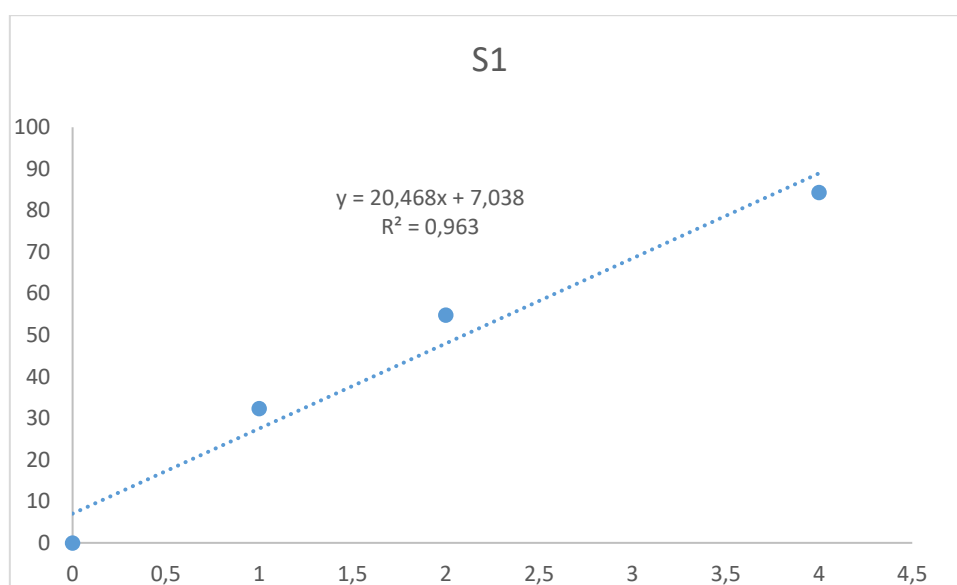


Figure III.33 : Le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de S1.

Tableau III.7 : Les calculs des concentrations inhibitrices médianes.

Code	CI _{50%} (mg /ml)
S1	2.1
S2	2.95
S3	1.41

L'activité antioxydante des supramolécules a été évaluée par le test DPPH, et les valeurs de CI_{50} obtenues varient de 1.41 à 2.95 mg/mL, indiquant une capacité équilibrée de piégeage des radicaux libres. L'échantillon S3, avec une CI_{50} de 1.41 mg/mL, présente la meilleure activité antioxydante, suivi de l'échantillon S1 (2.10 mg/mL) et de l'échantillon S2 (2.95 mg/mL). Toutefois, ces valeurs restent nettement plus élevées que celles des antioxydants standards tels que l'acide ascorbique ($CI_{50} \approx 0.005-0.020$ mg/mL) ou le trolox ($CI_{50} \approx 0.020-0.050$ mg/mL) selon la littérature [7].

Ces résultats suggèrent que, bien que les supramolécules possèdent une certaine activité antioxydante, leur efficacité reste limitée comparée à celle de composés de référence connus pour leur fort pouvoir réducteur. Cette activité confirme que les substituants phénoliques restent libres lors de la préparation des supramolécules.

III.6. CONCLUSION

La formation d'une supramolécule implique souvent des interactions non covalentes (liaisons hydrogène, $\pi-\pi$) qui modifient la structure spatiale et la répartition des charges de l'ensemble. Cette nouvelle structure peut :

- Favoriser la pénétration dans les membranes gram-négatives (comme *E. coli*) qui possèdent une double membrane fragile.
- Rendre la molécule moins efficace contre les Gram positifs, comme *S. aureus*, qui ont une paroi peptidoglycane épaisse.

On déduit que la configuration supramoléculaire peut :

- Renforcer l'affinité pour les PLP d'*E. coli*.
- Réduire l'affinité pour les PLP de *S. aureus*.

Selon les FTIR et les résultats des tests biologiques, on peut proposer les structures suivantes des supramolécules (Figure III.34, Figure III.35, et Figure III.36) :

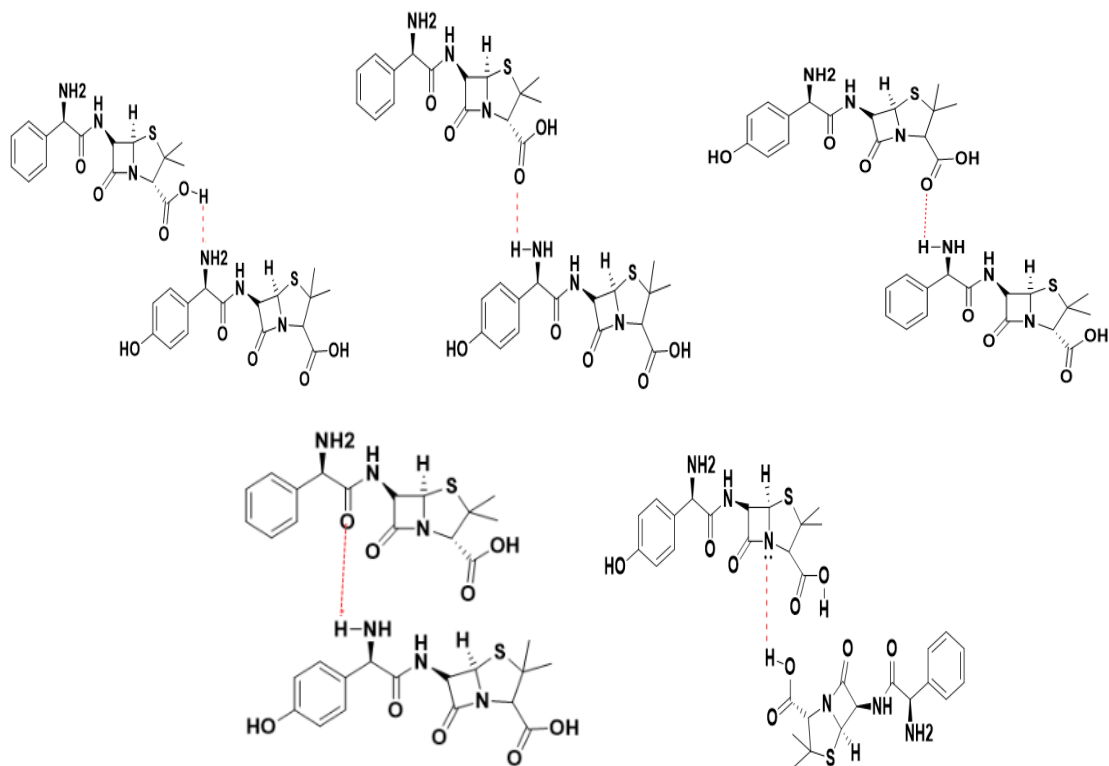


Figure III. 34 : Les probabilités structurales de S1

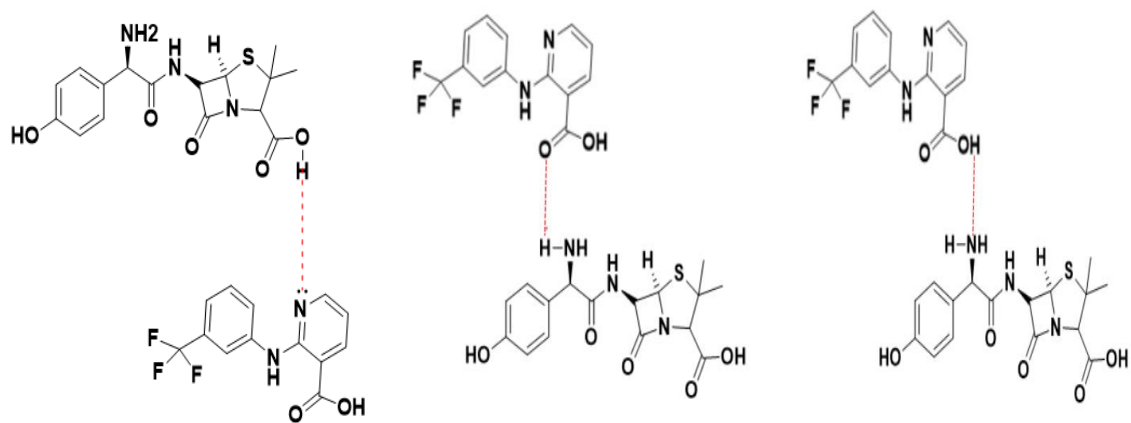


Figure III.35 : Les probabilités structurales de S2

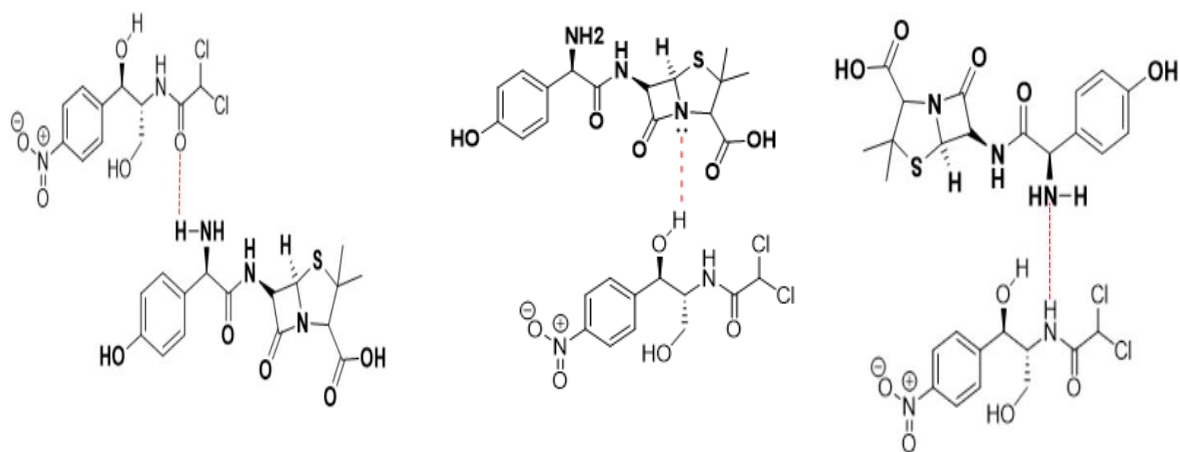


Figure III.36 : Les probabilités structurales de S3

Références résultats et discussions

1. Abdelmalek, I., Mesli, A., Svahn, I., & Simonneaux, G. (2017). *Cinnamaldehyde loaded-microparticles obtained by complex coacervation: Influence of the process parameters on the morphology and the release of the core material*. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 7(1), 1939–1944
2. Mouffok, M., Abdelmalek, I., Mesli, A., & Moulay, A. A. (2023). Investigation of factors affecting particle size distribution and sustained release of a water-soluble drug from cellulose derivatives microspheres. *Chemistry Africa*, 6(1), 163–173
3. Mouffok, M., Mesli, A., Abdelmalek, I., & Gontier, E. (2016). Formulation and characterization of ethylcellulose microspheres loaded with amoxicillin. *J. Serb. Chem. Soc.*, 81(0), 1–19.
4. Merdoud, A., Mouffok, M., Mesli, A., Chafi, N., & Chaib, M. (2020). In vitro release study of 2-aminobenzothiazole from microspheres as drug carriers. *J. Serb. Chem. Soc.*, 85(4), 531–545.
5. Pragathi, B., Rakesh, N., Madhuri, P., Rushma, S. K., Sireesha, V., & Ramesh, B. K. (2024) Code to Cure: AI Revolutionizing Drug Discovery *Int. J. Exp. Biomed. Res.*, 3(2), 11–20.
6. El-Haci, I. A., & Atik Bekkara, F. (2016). Estimation du pouvoir antioxydant des différents extraits organiques d'*Ecballium elaterium* (L.). *Rev. Subst. Nat. Innov. Thérapeutique*, 2(1), 1–12.
7. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.*, 19(6–7), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>

Conclusion générale

L'ensemble des résultats expérimentaux obtenus dans cette étude met en lumière l'importance des interactions supramoléculaires entre principes actifs pharmaceutiques et leur impact sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des systèmes élaborés. Trois combinaisons ont été explorées : amoxicilline-ampicilline (S1), amoxicilline-acide niflumique (S2) et amoxicilline-chloramphénicol (S3). Ces associations ont été analysées à travers une série de caractérisations spectroscopiques (UV-Visible, FTIR), diffraction (DRX). Des microsphères enrobant l'amoxicilline ou le S1 ont été préparées par la méthode d'évaporation du solvant et sont aussi caractérisées par FTIR, DRX, microscope optique et MEB. Des tests biologiques (antibactérien, anti-inflammatoire, antioxydant) ont été réalisés pour l'identification de l'efficacité de ces supramolécules.

Les analyses UV-Visible ont permis d'identifier des déplacements bathochromes ou hypsochromes des bandes d'absorption caractéristiques des principes actifs. Ces modifications sont des indicateurs directs de la formation de nouveaux ensembles supramoléculaires, révélant des interactions spécifiques entre les composants, notamment par liaisons hydrogène ou interactions π - π .

La spectroscopie FTIR a fourni une confirmation supplémentaire des interactions supramoléculaires. Des décalages, atténuations ou élargissements de bandes caractéristiques des groupements fonctionnels (C=O, N-H, OH) ont été observés, témoignant d'un réarrangement de l'environnement chimique dans les structures résultantes. La nature des interactions semble varier selon les systèmes : S1 et S3 montrent une implication marquée des groupes amide et amine, tandis que S2 révèle des interactions plus importantes au niveau des groupements carboxyliques et aromatiques.

Les analyses DRX ont souligné une transformation partielle ou totale des structures cristallines en états amorphes pour certaines associations, confirmant l'altération de l'organisation moléculaire due aux interactions. Cela est particulièrement marqué dans S3, qui passe à un état amorphe, renforçant l'idée d'une réorganisation complète du réseau moléculaire.

Sur le plan galénique, des microsphères ont été préparées à partir d'amoxicilline et S1. Ces systèmes encapsulés ont été caractérisés par des rendements d'encapsulation satisfaisants (>50 %), une distribution granulométrique polydispersée, et une morphologie contrôlée révélée par MEB. La structure amorphe des microsphères confirmée par DRX valide une encapsulation efficace.

Les études cinétiques ont mis en évidence un mécanisme de libération régulé par diffusion selon le modèle d'Higuchi, avec un effet Brust prononcé pour MS1, indiquant une localisation partielle du principe actif à la surface des particules. Cette localisation influe sur la vitesse et l'efficacité de la libération.

Sur le plan biologique, les tests antibiotiques ont montré des effets variables selon les systèmes et les souches testées. L'effet synergique a été clairement observé pour S1 contre *E. coli*, tandis qu'un effet antagoniste a été noté dans d'autres cas. L'activité anti-inflammatoire des supramolécules a quant à elle montré une réduction d'efficacité comparée aux principes actifs seuls, probablement due à un masquage des groupes fonctionnels actifs au sein des réseaux supramoléculaires. Enfin, l'activité antioxydante des systèmes S1, S2 et S3 a été confirmée, bien que leurs CI_{50} restent supérieures à celles des antioxydants standards.

En résumé, cette étude confirme que la formation de structures supramoléculaires influence profondément les propriétés physico-chimiques, pharmacocinétiques et biologiques des composés actifs. Ces structures peuvent améliorer certaines propriétés (stabilité, solubilité, libération prolongée) tout en modifiant d'autres (biodisponibilité, activité pharmacologique). Ce travail ouvre des perspectives prometteuses pour le développement de formulations médicamenteuses à libération contrôlée et/ou ciblée, bien que des études complémentaires soient nécessaires pour optimiser les propriétés biologiques et comprendre les mécanismes d'interaction au niveau moléculaire.

ANNEXE

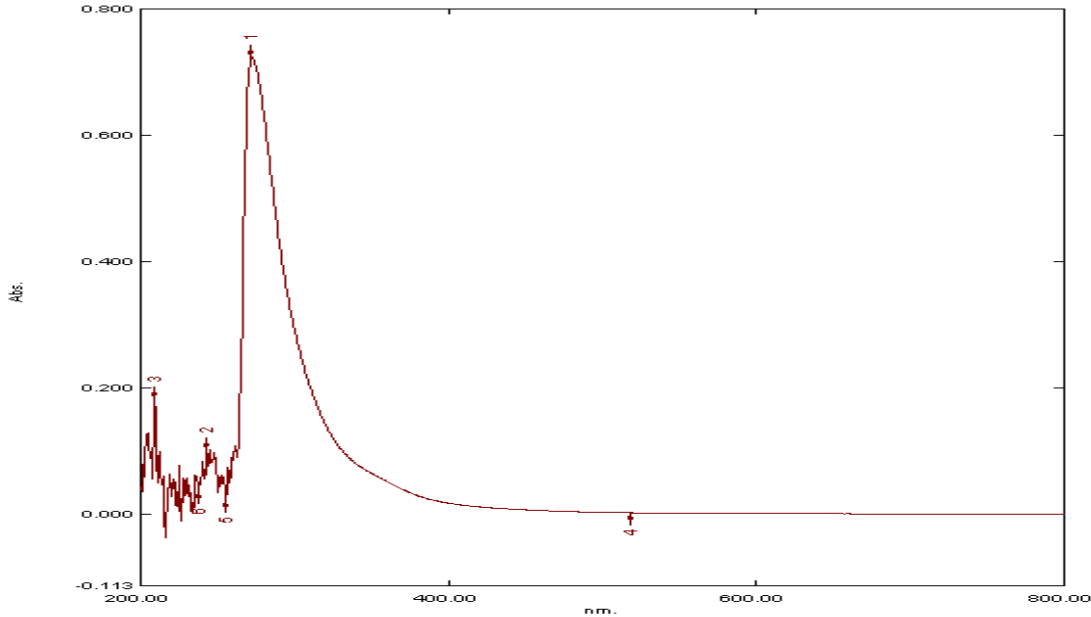


Figure : Spectre d'absorption de l'ampicilline dans le DMSO.

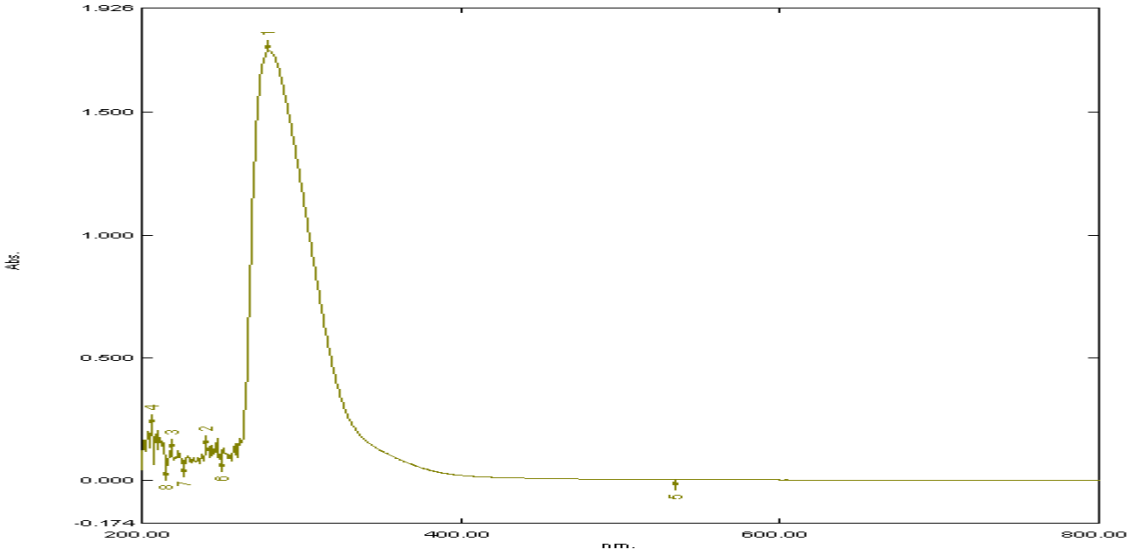


Figure : Spectre d'absorption de chloramphénicol dans le DMSO

ANNEXE

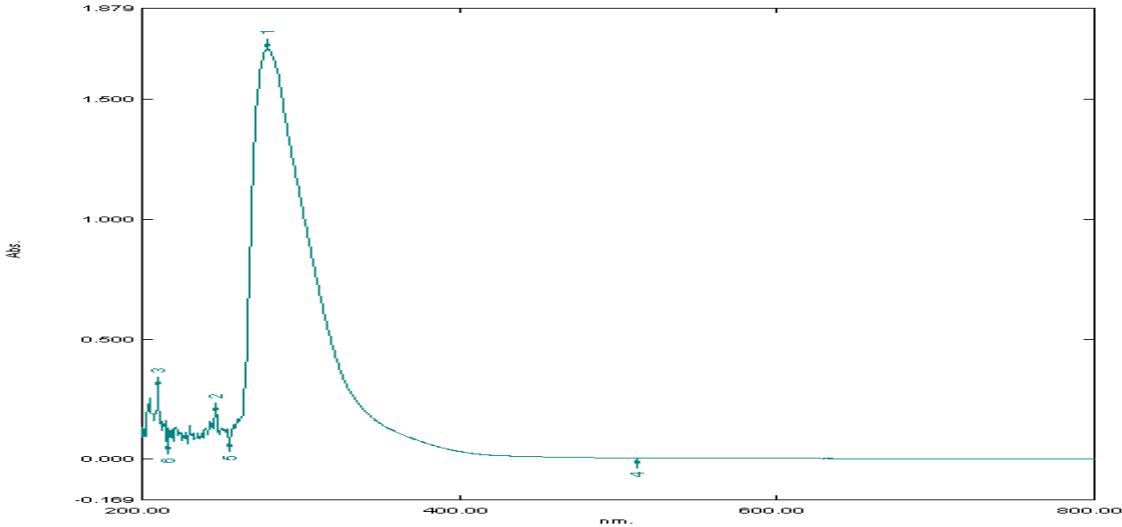


Figure : Spectre d'absorption de S3.

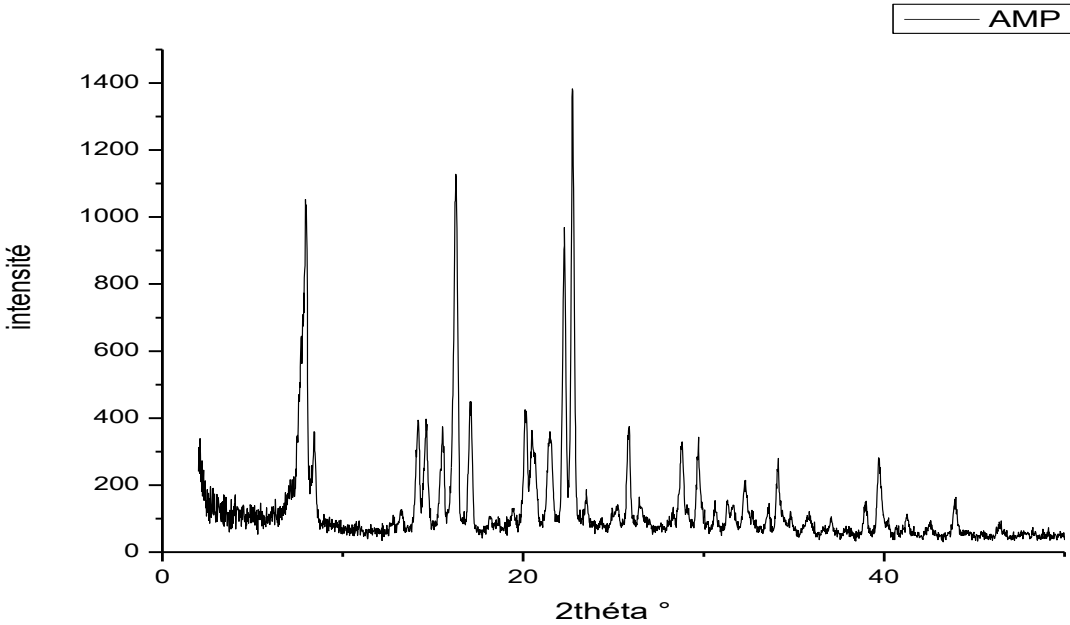


Figure : Le diffractogramme d'ampicilline

ANNEXE

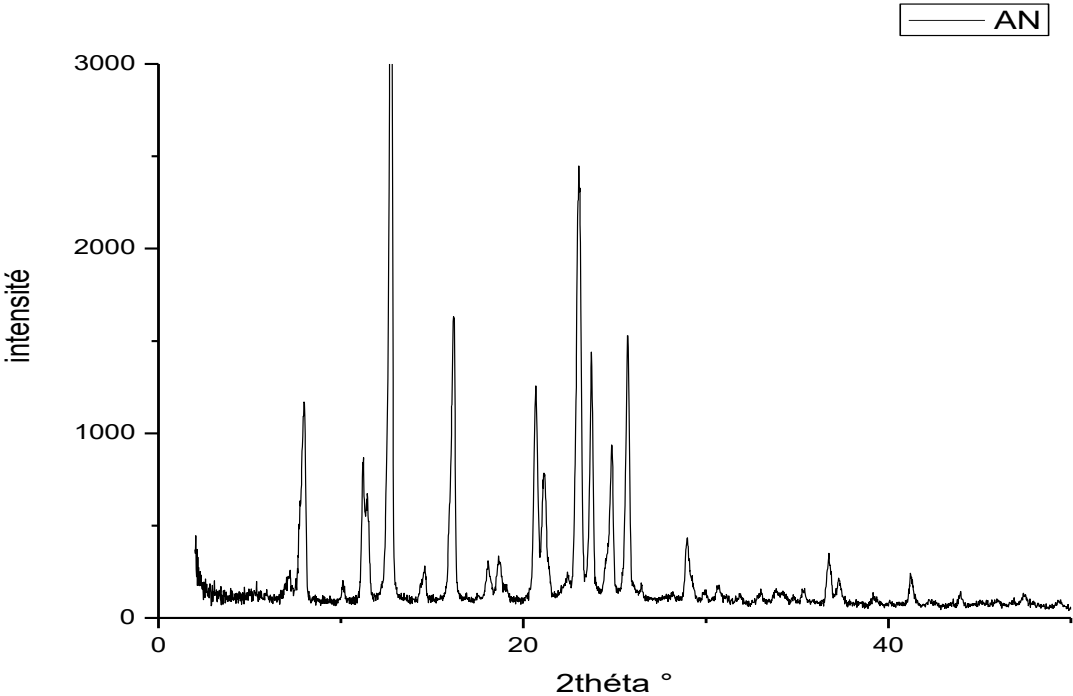


Figure : Le diffractogramme d'acide niflumique

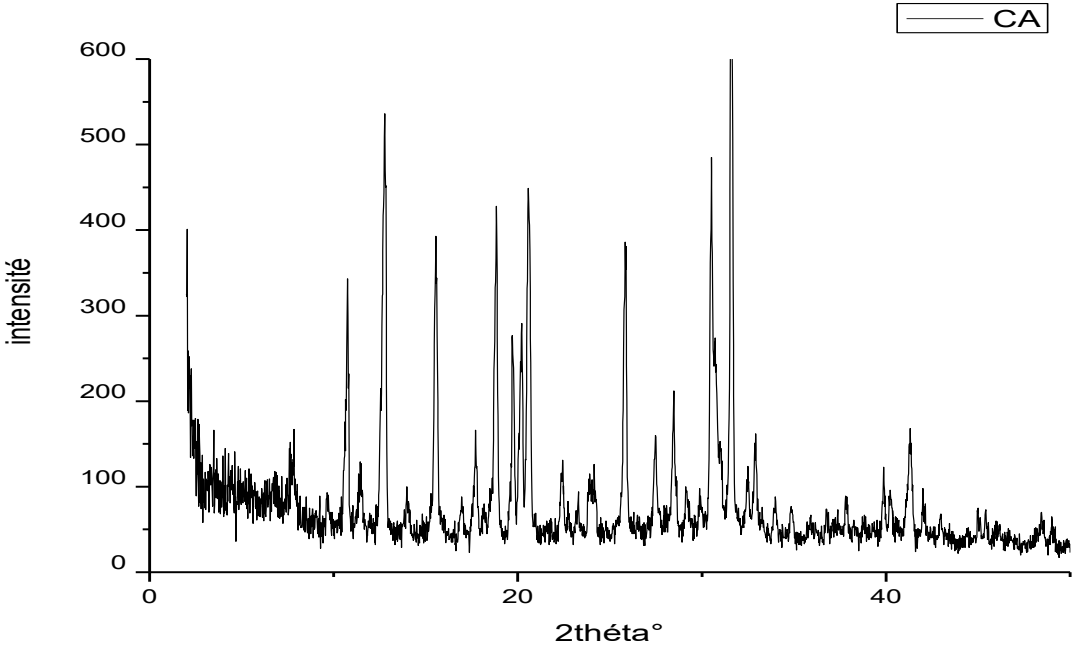


Figure : Le diffractogramme de chloramphénicol

ANNEXE

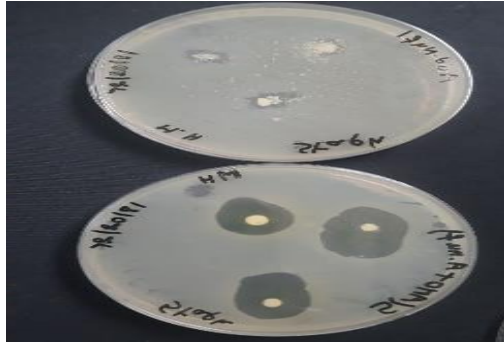


Figure : Résultats de l'inhibition de la souche *Staphylococcus* par AMO, S2



Figure : Résultats de l'inhibition de la souche *Staphylococcus* par AMO, AMP, S1.

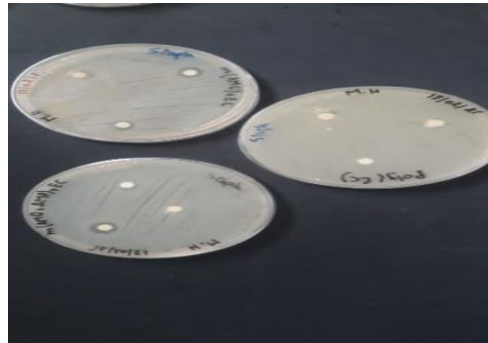


Figure : Résultats de l'inhibition de la souche *Staphylococcus* par EC, MS1 et MS2.

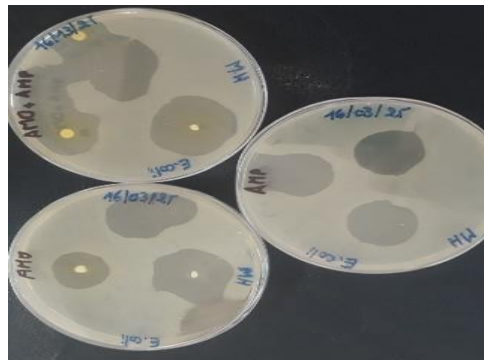


Figure : Résultats de l'inhibition de la souche *E. coli* par AMO, AMP et S1.

ANNEXE

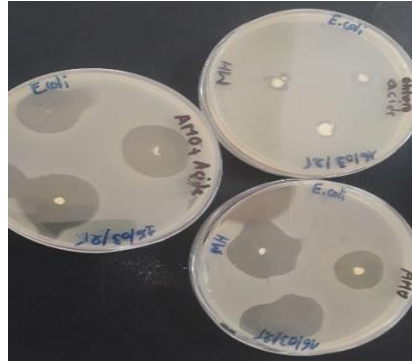


Figure : Résultats de l'inhibition de la souche *E. Coli* par AMO, AN et S2.



Figure : Résultats de l'inhibition de la souche *E. Coli* par EC, MS1 et MS2.

Tableau : Résultats granulométriques des microsphères de supramolécule.

Classe (μ m)	Centre de classe di (μ m)	Effectif ni	ni* di	Fréquence en nombre %	ni*di ²	Fréquence en surface %	ni*di ³	Fréquence en masse%	ni*di ⁴
0-100	50	133	6650	43,18181818	332500	3,328328328	16625000	0,629020053	831250000
100-200	150	80	12000	25,97402597	180000	18,01801802	270000000	10,21566402	4050000000
200-300	250	63	15750	20,45454545	393750	39,41441441	984375000	37,2446084	2,46094E+11
300-400	350	32	11200	10,38961039	392000	39,23923924	137200000	51,91070753	4,802E+11
	Somme	308	45600	100	999000	100	264300000	100	7,67625E+11

ANNEXE

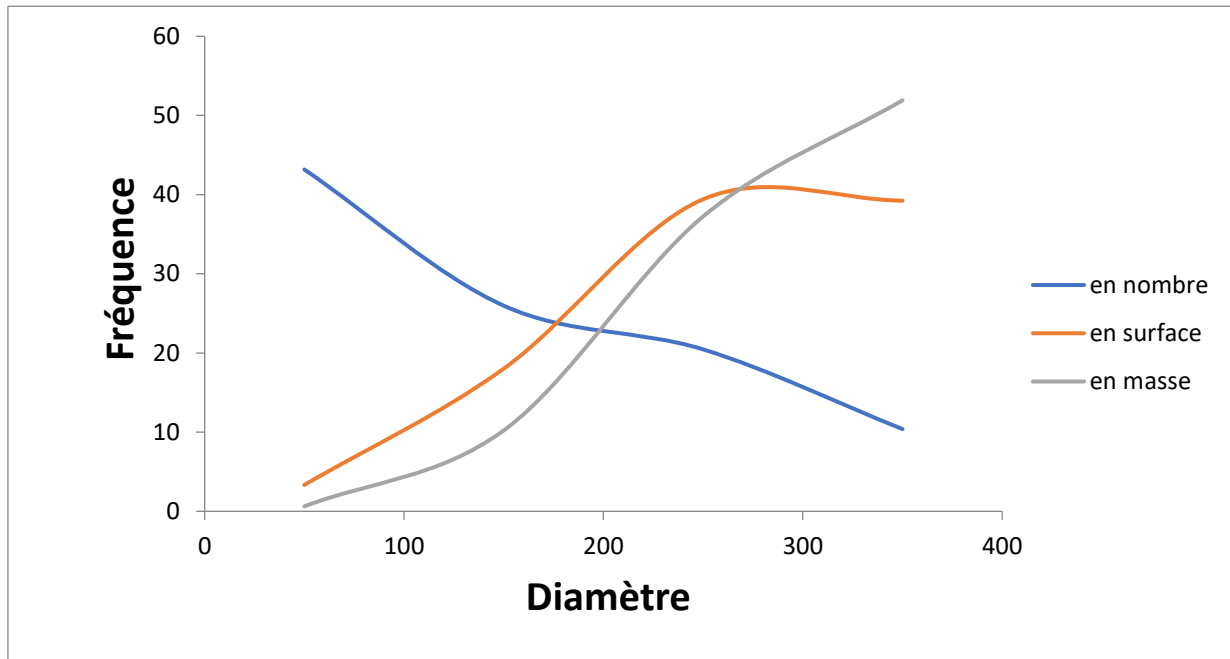


Figure : Courbes de distribution des tailles de MS2.

Tableau : Diamètre moyens des microsphères préparées.

Code	d10 (µm)	d32 (µm)	d43 (µm)	Dispersion
MS1	148	266	294	1.98
MS2	148	265	290	1.96

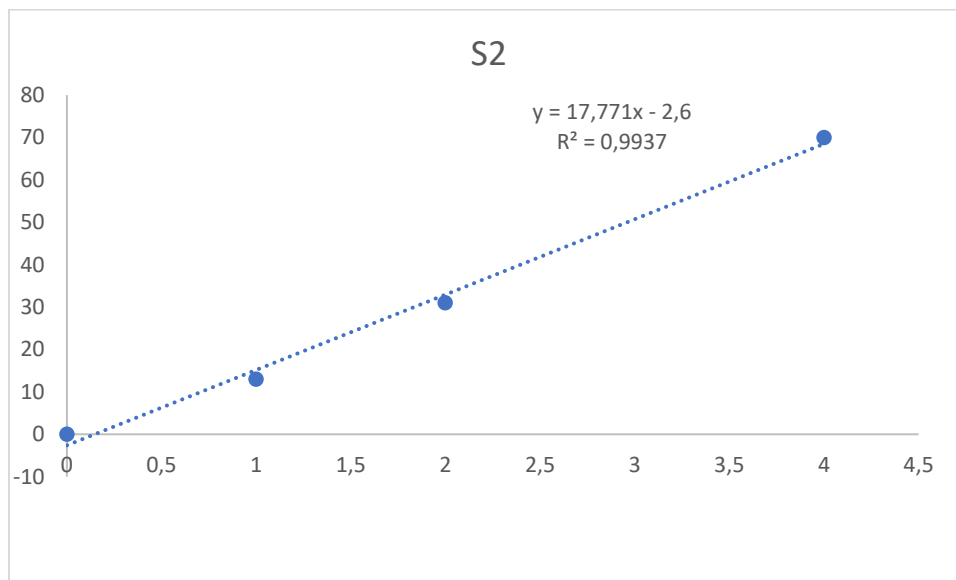


Figure : Le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de S2

ANNEXE

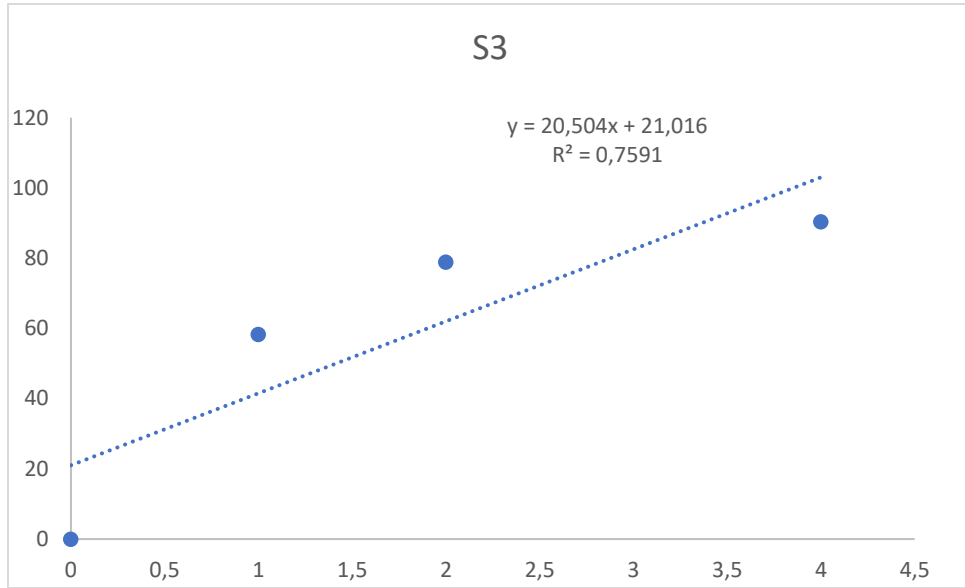


Figure : Le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de S3

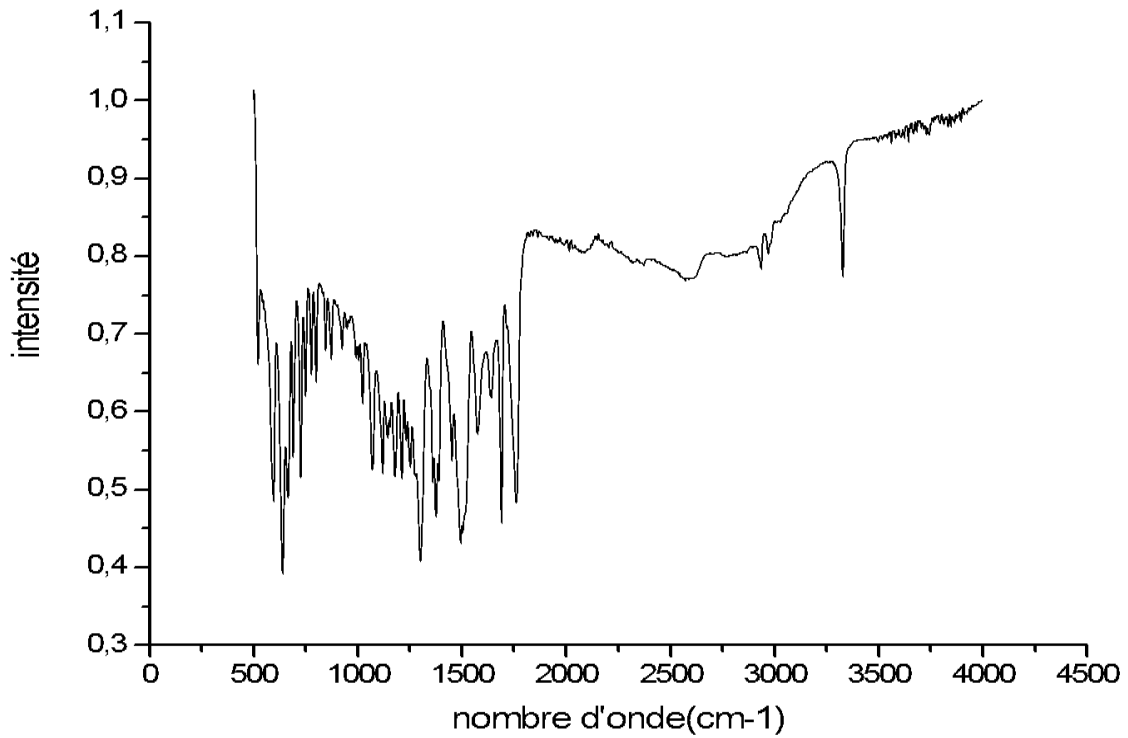


Figure III.6 : Spectre FTIR de AMP

ANNEXE

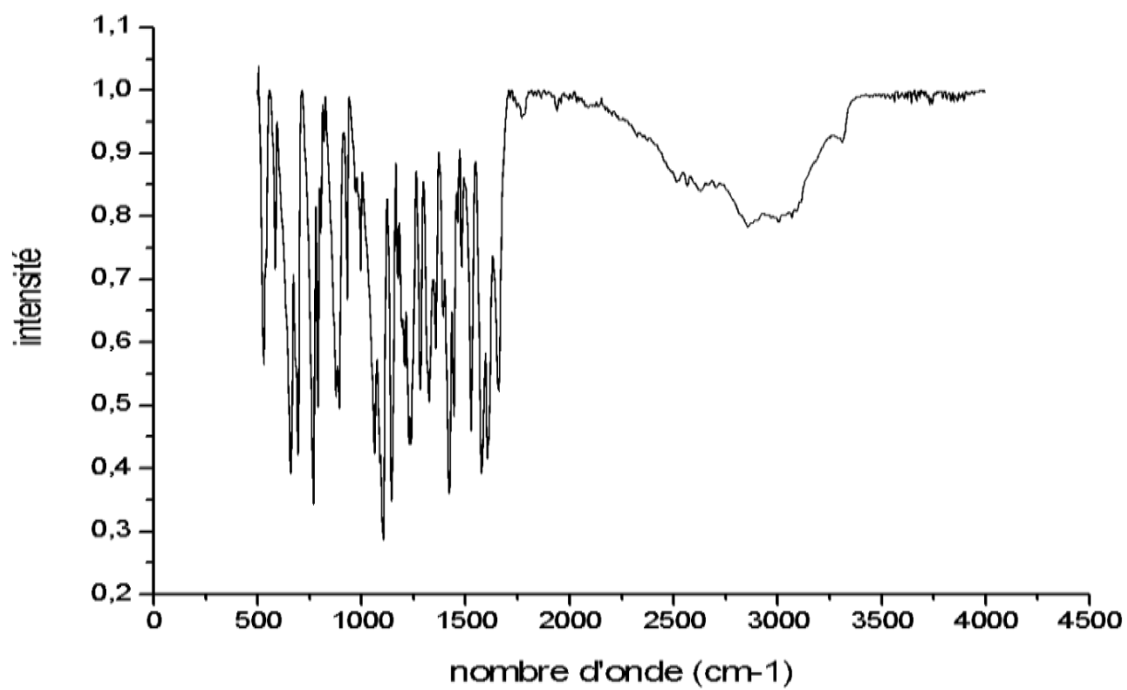


Figure III.7 : Spectre FTIR d'acide niflumique

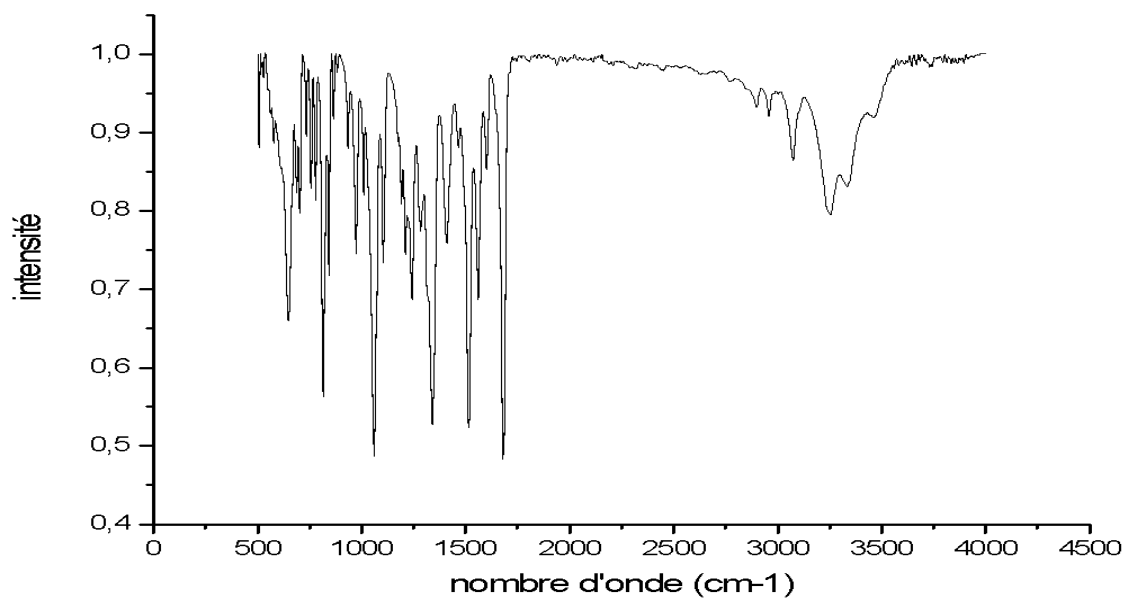


Figure III.8 : Spectre FTIR de Chloramphénicol