



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

Mémoire

Présenté par :

LARBI ZAHIRA & SEBGEUG NAIMA

Pour obtenir le diplôme de

Master II

Filière : Chimie

Spécialité: *Chimie des Polymères*

Sujet :

*Synthèse des microsphères à base de polymères
biodégradables PCL/PLGA
et étude de l'activité antibiotique.*

Soutenu le : 14/06/2017

Devant le jury:

Mlle M.HENNI	Présidente	UNIV .Tiaret
Mr B.DAHO	Examineur	UNIV .Tiaret
Mlle L.BENNABI	Encadreur	UNIV .Tiaret
Mme I.ABEDELEMALEK	Invitée	UNIV .Tiaret

Remerciements

Avant tout, Nous remercions *ALLAH* tout puissant de nous avoir donné la force et le courage pour terminer ce travail.

Nous tenons à remercier notre encadreur **Melle LAMIA BENNABI** (MAA) à UNIV IBN KHALDOUN TIARET pour sa disponibilité ses conseils, son orientation et surtout son aide, elle nous a toujours guidées dans la bonne direction dans notre travail.

Nous tenons à remercier la Présidente **Melle M.HENNI** (MAA) à UNIV IBN KHALDOUN TIARET pour avoir répondu présente pour présider ce jury et expertiser notre travail.

On tient à montrer notre gratitude à **Mr B.DAHO** (MAA) à UNIV IBN KHALDOUN.TIARET d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Un grand merci pour madame **LABEDELEMALEK** (MAA) pour sa participation dans notre travail

Nous adressons aussi nos sincères remerciements aux techniciens principalement à **Mr A.LARBI** pour leur disponibilité et leur aide qui ont permis d'apporter des améliorations à la qualité de ce rapport.

Nous n'oublions pas non plus nos enseignants, tout au long du cycle d'études à l'Université de Tiaret.

Dédicaces

Ce modeste travail est dédié :

A mes chers parents qui m'ont soutenu et encouragé durant

ma scolarité et durant toute ma vie.

A mes frères MOURAD et MOHAMED AYOUB

A mes amis FATIMA et REKAYA

A toutes les personnes qui nous ont apportés de l'aide.

Larbi Zahira

Dédicaces

Je dédie mon mémoire de master :

- A mes chers parents

- A mon cher frère : Mohamed Amine

- A mes sœurs : Fatima, Karima, Meriem, Siham.

-- A mes amis intimes: Souad et Halima.

- A tous qui me connais de loin et de près.

N.Sebgueg

Sommaire

Introduction générale.....1

Chapitre I : Etude bibliographique

I. 1. Historique des polymères biodégradables.....3

I. 1.1. Classification.....4

I. 1.2. Applications et propriétés.....6

I. 2. La polycaprolactone.....7

I. 2.1. Introduction.....7

I. 2.2. Définition.....7

I. 2.3. Propriétés thermique et cristallinité.....8

I. 2.4. Dégradation de la PCL.....8

I. 2.5. Synthèse de la PCL.....8

I. 3. L'acide poly (lactique-co-glycolique).....11

I. 3.1. Introduction.....11

I. 3.2. Définition.....12

I. 3.3. Propriétés physico-chimiques de l'acide poly
(lactique-co-glycolique).....12

I. 3.4. Biodégradabilité et biocompatibilité de l'acide poly
(lactique-co-glycolique).....14

I. 3.5. Les facteurs influençant la libération de substances actives et la
dégradation du polymère.....15

Chapitre II : Etude bibliographique

Partie A : Microencapsulation.....18

II. 1. Introduction.....18

II. 2. Caractéristiques générales des microparticules	18
II. 2.1. Structure et taille.....	18
II. 3. Les facteurs influençant la morphologie des microparticules	19
II. 3.1. Les paramètres de composition.....	19
II. 3.2. Les paramètres de formulation (physico-chimique de procédé).....	20
II. 4. Les différents procédés de microencapsulation	20
II. 4.1. Procédés physico-chimiques.....	20
II. 4.2. Procédés chimiques.....	24
II. 4.3. Procédés mécaniques.....	25
II. 5. Application de la microencapsulation	26
Partie B : L'activité antibiotique	28
II. 1. Introduction	28
II. 2. Micro-organismes utilisés	28
II. 3. Les Antibiotiques	29
II. 3.1. Paramètres d'activité d'un antibiotique.....	29
II. 3.2. Méthodes d'étude de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques.....	30
II. 4. Techniques d'études in vitro du pouvoir antimicrobien	30
II. 4.1. Technique d'étude en vapeur.....	30
II. 4.2. Technique d'étude sur milieu solide.....	31
Chapitre III : Etude Expérimentale	
Partie A : Synthèses et Caractérisations	33
III. 1. Synthèse chimique des microsphères à base des polymères et la gélatine	33
III. 1.1. Identification des produits.....	34
III. 1.2. Mode opératoire.....	39
III. 2. Caractérisation des microsphères	41

III. 2.1. Distribution de taille.....	41
III. 2.2. Spectroscopie Infrarouge.....	47
III. 2.3. Par DRX	50
III. 3. Etude de la cinétique de la libération de principe actif dans le pH=1.2 et le pH=7.4.....	52
III. 3.1. Facteurs influençant les transferts de matières.....	52
III. 3.2. Conditions de mesures	53
III 3.3. Mode opératoire.....	56
Partie B: L'activité antibiotique.....	59
III. 1. Introduction.....	59
III. 2. Antibiogramme.....	59
III. 2.1. Méthodes de dilution.....	59
III. 2.2. Méthode de la diffusion en disque.....	61
III. 3. Mode opératoire.....	66
III. 3. 1. Préparation de la suspension.....	66
III. 3. 2. La méthode de dilution en milieu liquide.....	66
III. 3. 3. La méthode de diffusion par disque.....	67

Introduction générale

Le développement de la chimie des polymères a permis la synthèse de polymères biocompatibles et même biodégradables. Grâce à ces propriétés, ces polymères trouvent des applications en pharmacologie, notamment dans la mise au point de nouveaux systèmes de formulation de principes actifs.

Ces polymères synthétiques biodégradables tels que les poly(anhydrides), les poly(amides) et surtout les poly(esters) aliphatiques [(polymères d'acide lactique (PLA), copolymères d'acides lactique et glycolique (PLGA), et poly- ϵ -caprolactone (PCL)] sont principalement utilisés pour le développement de formes galéniques innovantes .

Parmi eux, les polymères les plus attractifs et donc les plus couramment utilisés sont le PLGA, le PLA et la PCL. De plus, leur utilisation dans la libération des principes actifs a été autorisée par la FDA (Food and Drug Administration) ou l'EMA (European Medicines Agency).

Ces polymères ont été les premiers à être utilisés pour la fabrication de sutures utilisables chez l'homme grâce à leurs caractéristiques de résorption.

En effet, leurs excellentes propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité en ont fait des polymères très intéressants pour l'obtention de systèmes à libération prolongée.

Ainsi, lors de leur dégradation dans le corps, ces polymères sont hydrolysés jusqu'à l'obtention de produits facilement assimilés par l'organisme.

Ils sont compatibles à l'encapsulation qui fait référence aux technologies permettant de formuler un (ou plusieurs) principe(s) actif(s) au sein de particules individualisées présentant une géométrie et des propriétés spécifiques.

Dans ce travail, il a été effectué une recherche bibliographique sur les polymères biodégradables et biocompatibles, ainsi que sur la microencapsulation de molécules actives, ensuite une recherche sur l'activité antibiotique ,dans le premier volet ,dans la seconde partie on s'est concentré sur l'encapsulation de l'érythromycine par la méthode d'évaporation de solvant en utilisant comme matrices des polymères biodégradables : le PCL et le PLGA

La procédure se fait suivant un mécanisme physique et des conditions physico-chimiques (PH, volume du solvant utilisé, vitesse d'agitation, température) qu'ils ont un effet sur l'encapsulation et la formation des microsphères.

Les objectifs principaux de ce projet sont :

- L'étude des conditions de formation des microsphères.
- La cinétique et la libération de l'érythromycine à partir de système blend polymère/solvant bien définit.
- Son effet antibiotique par apport aux souches référenciées : E.ch, Pseudo, S.aru dans le pH 7.4.

Chapitre 1 :

Etude bibliographique

« Rappel sur les

polymères

biodégradables »

Ce chapitre a pour objectif de faire le point sur de quelques travaux sur des polymères organiques biodégradables, notamment ceux rentrant dans le cadre de notre travail : le polycaprolactone (PCL) et l'acide poly lactique-co-glycolique(PLGA).

Nous allons tout d'abord faire un bref historique sur des polymères biodégradables, leur classification, leur propriété ensuite étudier en détails leur mode d'application en microencapsulation.

I. 1. Historique des polymères biodégradables :

L'industrie des matières plastiques représente, en termes de volume et de diversités de secteurs d'applicatifs, un volet majeur du secteur industriel de la chimie [1]. Par ailleurs, face à la baisse des réserves en énergies fossiles, le renchérissement consécutif du pétrole et la nécessité de valoriser les sous-produits agricoles, ce secteur dépendant essentiellement des ressources fossiles devra rapidement trouver une alternative aux matières premières conventionnelles qu'il utilise. Par leur abondance et leur diversité, les ressources végétales offrent une nouvelle source de matières premières renouvelables en industrie plastique. Grâce à leurs propriétés de biodégradabilité pour certains, ces polymères pourraient constituer une solution aux problèmes environnementaux engendrés par les importants tonnages de déchets plastique.

De par leur structure chimique, les bipolymères présentent des propriétés particulières et intéressantes pour des applications bien spécifiques en industrie plastique [2]. Le plus souvent, la biodégradabilité est la première propriété qui est mise en avant dans la littérature, pour ces polymères [3,4]

Dans les bipolymères, les polymères biodégradables présentent souvent des propriétés mécaniques réduites comparés aux polymères de grande diffusion. Il est possible de les améliorer en les renforçant à l'aide de fibres libériennes comme le lin, le chanvre, etc. Le renforcement de ces polymères par des fibres végétales peut permettre de fabriquer des matériaux composites dont les propriétés peuvent être exploitées dans des domaines techniques très pointus (automobile, matériels sportifs, etc.)Jusqu'à présent, trois grands créneaux d'applications sont identifiés par rapport aux propriétés des bipolymères : la médecine, l'agriculture et les emballages [3,5]. Par ailleurs, le secteur du bâtiment et de l'éco-construction s'intéresse de plus en plus à ce type de matériaux.

Les matériaux polymères biodégradables peuvent être dégradés par voie chimique, physique et/ou biologique, et il est rare qu'une seule voie intervienne lors d'un processus de dégradation. Cette dégradation est un ensemble de phénomènes aboutissant à une déstructuration moléculaire des constituants du matériau. Elle est en général précédée d'une fragmentation. De ce fait, il est impératif de faire une distinction entre la dégradation et la biodégradation. Un matériau ne se biodégrade pas sauf s'il est en contact avec un environnement favorable en microorganisme. En effet, il peut y avoir confusion avec la photodégradation (dégradation sous l'effet des rayons ultra-violet), la biofragmentation (biodégradation des additifs et dégradation physique du polymère sans désintégrations moléculaires des éléments synthétiques), la dégradation chimique (hydrolyse, oxydation des liaisons carbone-hydrogène si le matériau est dit oxodégradable) et enfin la biodégradation en présence des microorganismes.

Un matériau biodégradable se définit comme un matériau susceptible de subir une dégradation par action enzymatique des microorganismes en dioxyde de carbone, méthane, eau, composés inorganiques et biomasse. La biodégradabilité peut être mesurée par des tests standards sur une période spécifique [6].

L'industrie des matières plastiques produit déjà en masse, un grand nombre de polymères biodégradables, dont certains sont composés de matières premières renouvelables. Leurs propriétés encore perfectibles suffisent déjà pour de nombreuses applications [6,7].

I. 1.1. Classification :

Selon l'origine des matières premières et des voies de synthèse, différentes classifications de polymères biodégradables sont proposées. La figure I.1 permet de distinguer deux grandes familles de polymères biodégradables : les agro-polymères et les polyesters biodégradables [6,8,9].

Les agro-polymères sont directement extraits de la biomasse et sont fabriqués à partir de polymères naturels d'origine végétale ou animale. La famille la plus importante est celle des polysaccharides (glucides) comme l'amidon, la cellulose, la lignine ou des protéines comprenant la caséine, le gluten ou le collagène qui sont sujets actuellement à de nombreux travaux. On retrouve ces polymères dans le bois, la viscose, la cellophane et dans toutes les fibres textiles d'origine naturelle (coton, lin, sisal...) [6,10].

Les polyesters biodégradables sont, soit produits par des microorganismes, soit issus de monomères bio-dérivés ou de la pétrochimie. Comme le montre la figure I.1[11], les

polyesters se divisent en deux grands groupes, les polyesters aliphatiques et les polyesters aromatiques. Alors que les polyesters aromatiques classiques tel que le polyéthylène téréphtalate(PET) présentent d'excellentes propriétés (résistance aux chocs, à la traction, perméabilité aux gaz...), ils s'avèrent être presque totalement résistants à l'attaque microbienne [12].

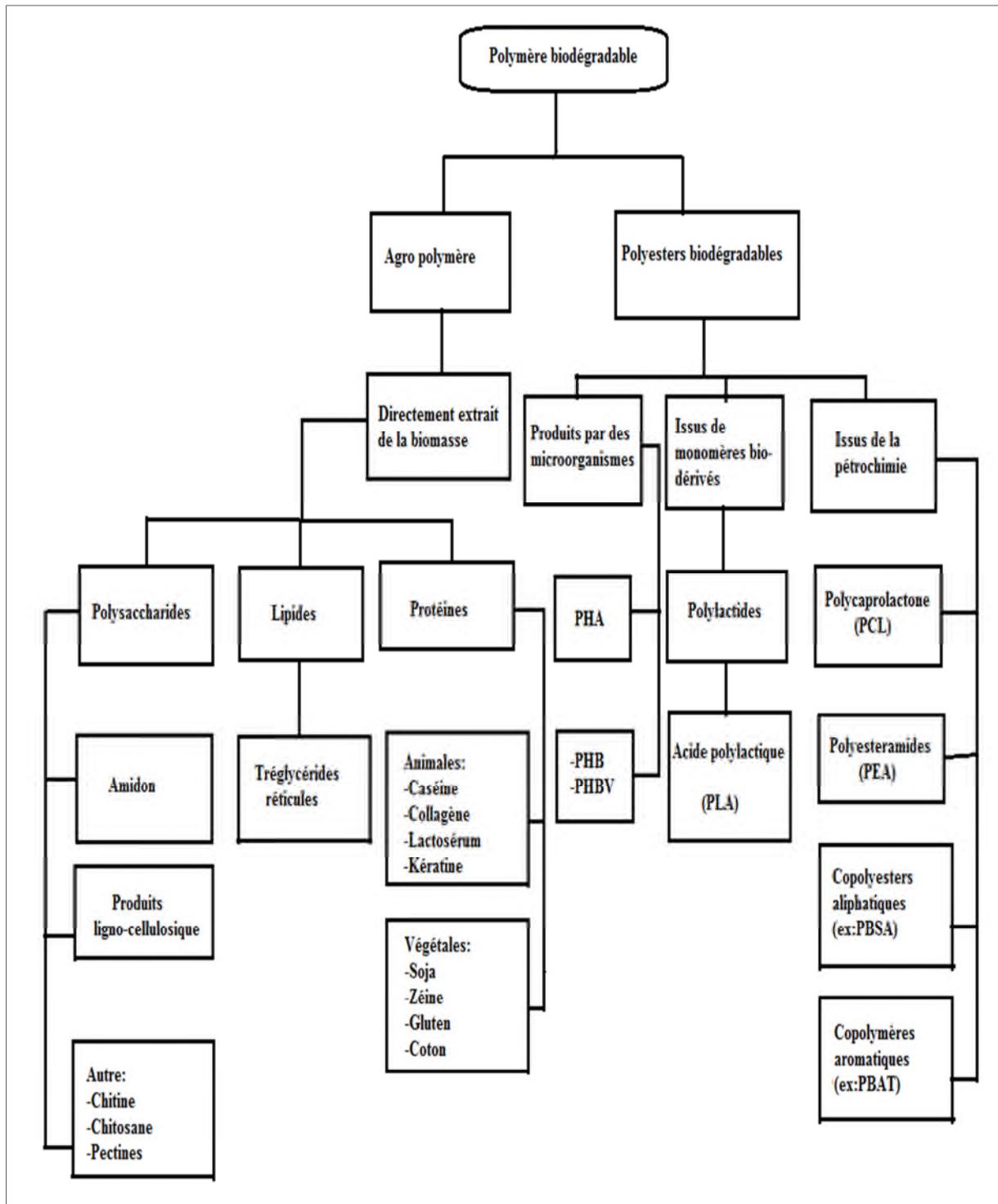


Figure I.1 : Classification des polymères biodégradables.

Les polyesters aliphatiques bio-sources, en revanche, sont facilement biodégradables, mais leurs propriétés mécaniques sont parfois insuffisantes pour certaines applications. La plupart des polyesters aliphatiques synthétiques sont synthétisés à partir des diols et des acides dicarboxyliques par l'intermédiaire d'une polymérisation de condensation [11].

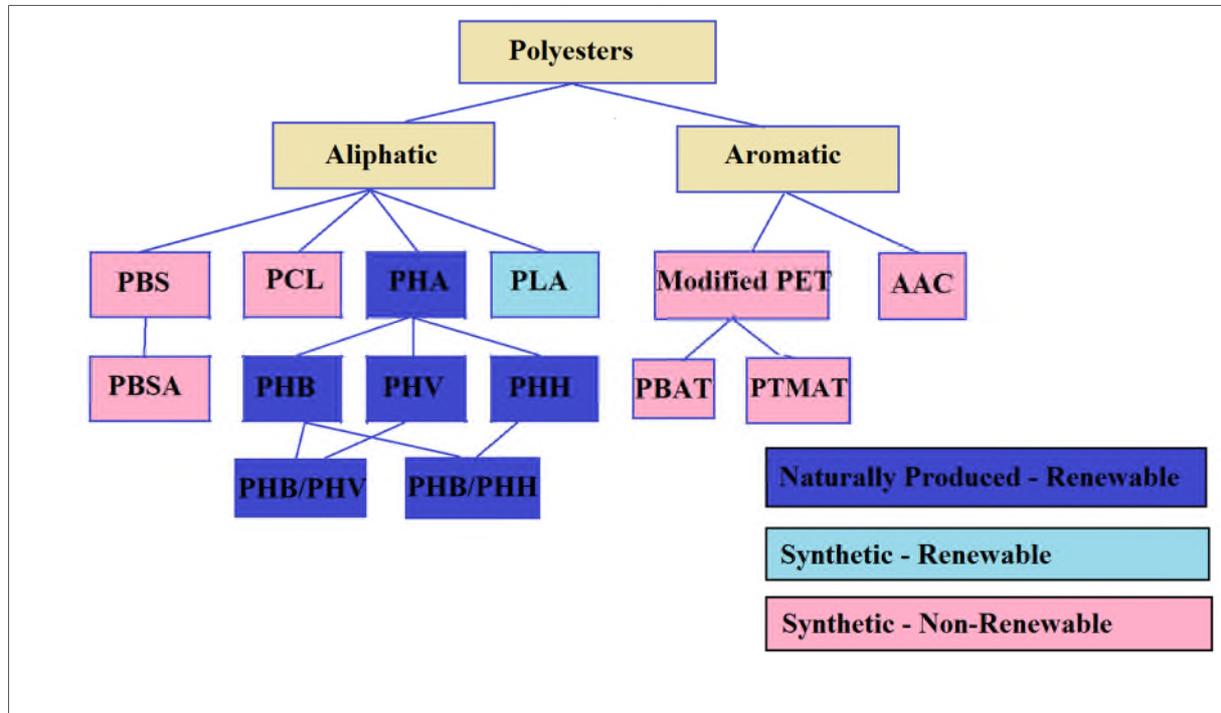


Figure I.2 : Les familles des polyesters biodégradables.

I. 1.2. Applications et propriétés :

Les premières applications des polymères biodégradables sont médicales (sutures chirurgicales, greffes vasculaires, dispositifs de fixation d'os, etc.), ou leurs coûts élevés peuvent être compensés par une haute valeur ajoutée. Par exemple pour le PLA, le PGA (acide polyglycolique), le PLGA (acide polylactique-co-glycolique), leurs propriétés de biocompatibilité (sans effets indésirables sur l'environnement biologique) et de biorésorbabilité (décomposition naturelle dans l'organisme humain) associées à leur résistance mécanique sont très importantes pour assurer les fonctions attendues dans ce domaine [2,3]. Ces biopolymères ne présentent aucune toxicité pour l'organisme.

Les biopolymères sont également utilisés pour des applications plus pointues comme dans le secteur de l'industrie automobile, l'électronique ou encore dans la construction. Dans le domaine des applications à faible valeur ajoutée, les secteurs visés par les biopolymères concernent particulièrement les objets à usage unique, à courte et moyenne durée de vie. On y

retrouve notamment : les sacs de collecte des déchets et de sortie de caisses, l'emballage ménager et la restauration ainsi que les films pour paillage agricole [12].

La plupart des polymères biodégradables comportent des liaisons hydrolysables telles que amide, ester, acétal, anhydride et. La présence de fonctions chimique sur les molécules leur attribue des propriétés particulières et des facilités à réagir avec d'autres molécules [2]. Néanmoins, les polyesters aliphatiques, sont apparus les plus prometteurs grâce à leur biocompatibilité et leur dégradabilité [13].

Le développement de la chimie des polymères a permis la synthèse de polymères biocompatibles et même biodégradables. Grâce à ces propriétés, ces polymères trouvent des applications en pharmacologie, notamment dans la mise au point de nouveaux systèmes de formulation de principes actifs.

I. 2. La polycaprolactone :

I. 2.1. Introduction :

La polycaprolactone (PCL) est un polymère qui présente un grand intérêt en ingénierie et domaine biomédicale. Toutefois, sa vitesse de dégradation est généralement trop lente. Pour modifier ses propriétés, par exemple, favoriser l'adhésion de cellules, la diffusion de principes actifs et de nutriments et améliorer sa dégradabilité [14].

I. 2.2. Définition :

La PCL est un polyester aliphatique biodégradable, biocompatible et non-toxique [15] d'origine fossile (pétrochimique) [Figure I.3] aux propriétés thermoplastiques. Ce polymère a connu récemment un intérêt grandissant car son domaine d'application s'étend de l'industrie de l'emballage aux applications biomédicales (structures, implants, libération contrôlée...).

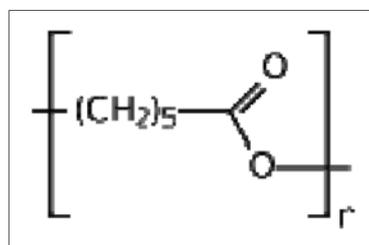


Figure I.3 : Structure de polycaprolactone PCL.

I. 2.3. Propriétés thermique et cristallinité :

La température de décomposition thermique de la PCL est très élevée, de l'ordre de 300-350°C, ce qui facilite sa mise en œuvre sur une large plage de températures. Son taux de cristallinité varie en fonction de la masse molaire.

Plus la masse molaire moyenne en nombre augmente, plus la cristallinité diminue car les chaînes des masses faibles ont plus de facilité à s'organiser en cristaux. Par sa très basse température de transition vitreuse $T_g = (-65) - (-60) ^\circ\text{C}$, la PCL est à température ambiante un polymère plutôt mou, d'aspect caoutchouteux. Il est impossible de l'obtenir à l'état amorphe.

Cette faible T_g , bien inférieure à la température corporelle, lui permet d'être alors utilisée pour la libération contrôlée de principes actifs.

I. 2.4. Dégradation de la PCL :

La PCL étant un polymère biocompatible et biorésorbable, sa dégradation a été largement étudiée ces 30 dernières années. Les dégradations hydrolytiques, enzymatiques et par les organismes vivants ont donné des résultats plus ou moins intéressants selon les applications envisagées [16].

I. 2.5. Synthèse de la PCL :

Elle est obtenue par polymérisation d'ouverture de cycle de la lactone correspondante, la CL, catalysée par un catalyseur à base d'étain, plus précisément, l'octanoate d'étain. Bien que son utilisation essentielle consiste en son incorporation (sous forme d'oligomères terminées par des fonctions alcools en réaction avec des dérivés diisocyanates) dans la formulation de polyuréthanes, la PCL, de hautes masses molaires, trouve aussi une application comme un film de paillage agricole, pots de plantation et sacs poubelles. La firme bioplastiques etc.

I. 2.5.a) Mécanisme de la polymérisation de la CL par ouverture de cycle :

Comme toutes les polymérisations en général, la polymérisation par ouverture de cycle est une réaction équilibrée (Figure I.4).

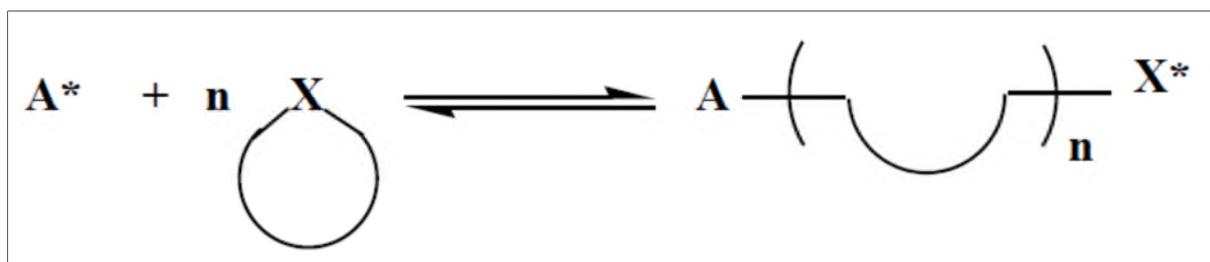


Figure I.4 : Schéma général d'une polymérisation par ouverture de cycle.

D'autres réactions équilibrées ont lieu au cours de la polymérisation, il s'agit des réactions secondaires : rétro-scissions ou trans-estérifications intramoléculaires et redistributions ou trans-estérifications intermoléculaires (Figures I.5 et I.6).

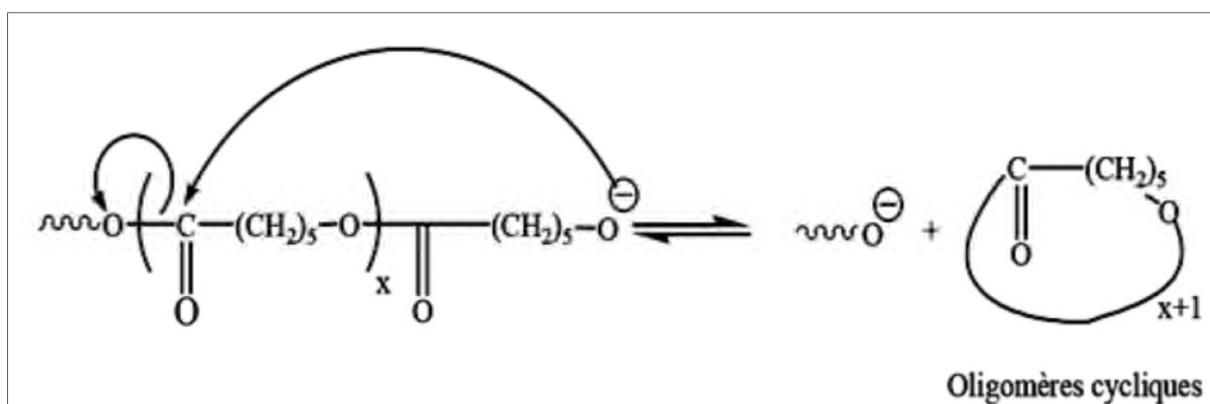


Figure I.5 : Réaction de rétroscission.

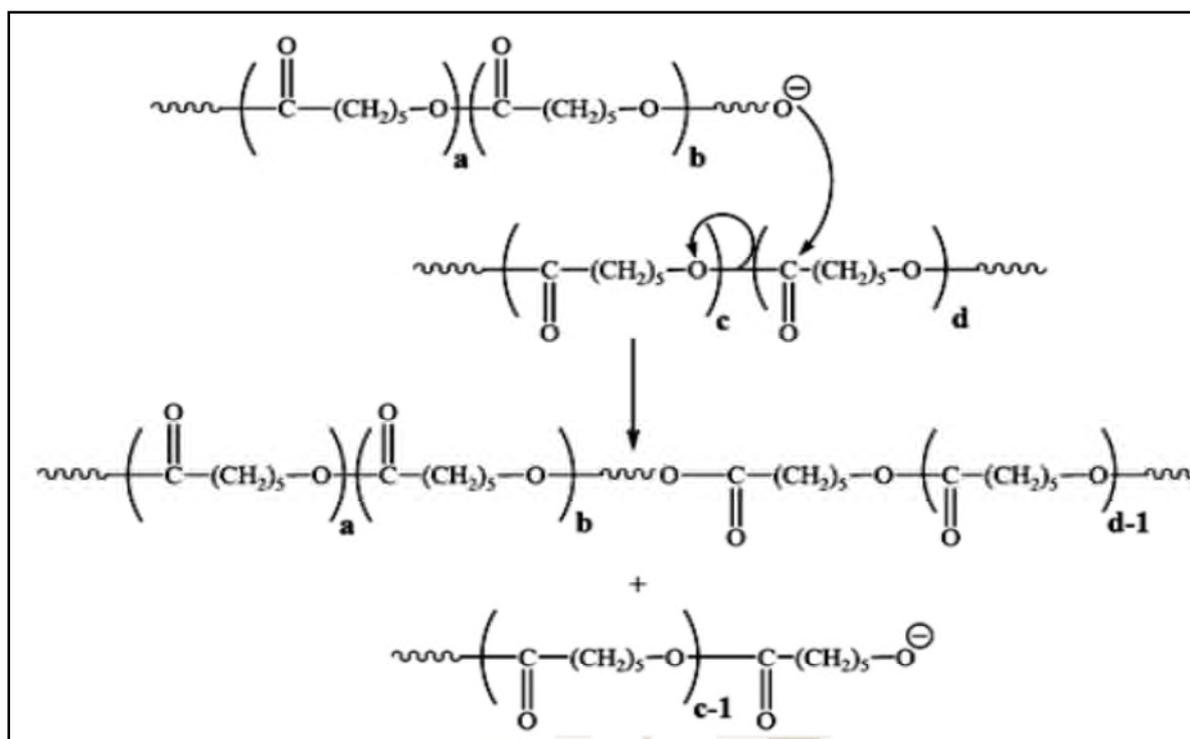


Figure I.6 : Réaction de redistribution

Depuis les années soixante, de nombreuses études ont été menées. Selon les amorceurs utilisés.

La polymérisation par ouverture de cycle de la CL peut s'effectuer selon différents mécanismes (cationique, anionique, coordination).

I. 2.5.b) Mécanisme cationique de la polymérisation par ouverture de cycle de la CL :

On peut classer les amorceurs utilisés en polymérisation cationique par ouverture de cycle en quatre groupes :

- Les acides protoniques (HCl, RCO₂H, RSO₃H...)
- Les acides de Lewis (AlCl₃, BF₃, FeCl₂, ZnCl₂...)
- Les agents alkylants (CF₃SO₃CH₃, (CH₃)₂I (+) (-) SbF₆...)
- Les agents acylants (CH₃CO(+) (-) SbF₆)

Le mécanisme de polymérisation cationique des lactones qui avait d'abord été proposé par Cherdron et al [17]. Il consistait en une attaque électrophile sur l'oxygène endocyclique de la lactone qui entraînait la rupture de la liaison acyl-oxygène avec la formation d'un ion acyl carbonium susceptible de propager la réaction.

Ce mécanisme a été remis en cause par Penczek et al [18]. En 1984 la lactone est en fait méthylée dans un premier temps puis on assiste à la rupture de la liaison oxygène-alkyle de l'hétérocycle (Figure I.7) [19]. En ce qui concerne la polymérisation de l' ϵ -caprolactone, le mécanisme est le suivant :

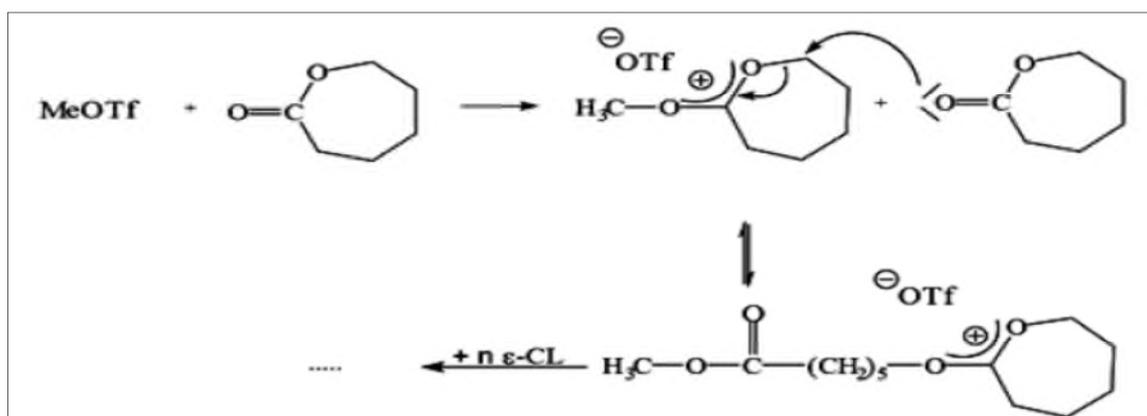


Figure I.7 : Mécanisme de la polymérisation cationique de l' ϵ -caprolactone proposé par Penczek et al.

I. 2.5.c) Mécanisme anionique de la polymérisation par ouverture de cycle de la CL :

Le mécanisme de la polymérisation anionique repose sur une attaque nucléophile de l'amorceur sur le carbone électropositif de la fonction carbonyle du monomère, suivie du clivage de la liaison oxygène-acyle (Figure I.8). Ce mécanisme a été confirmé par les études de Kricheldorf [20] et d'Hofman [19].

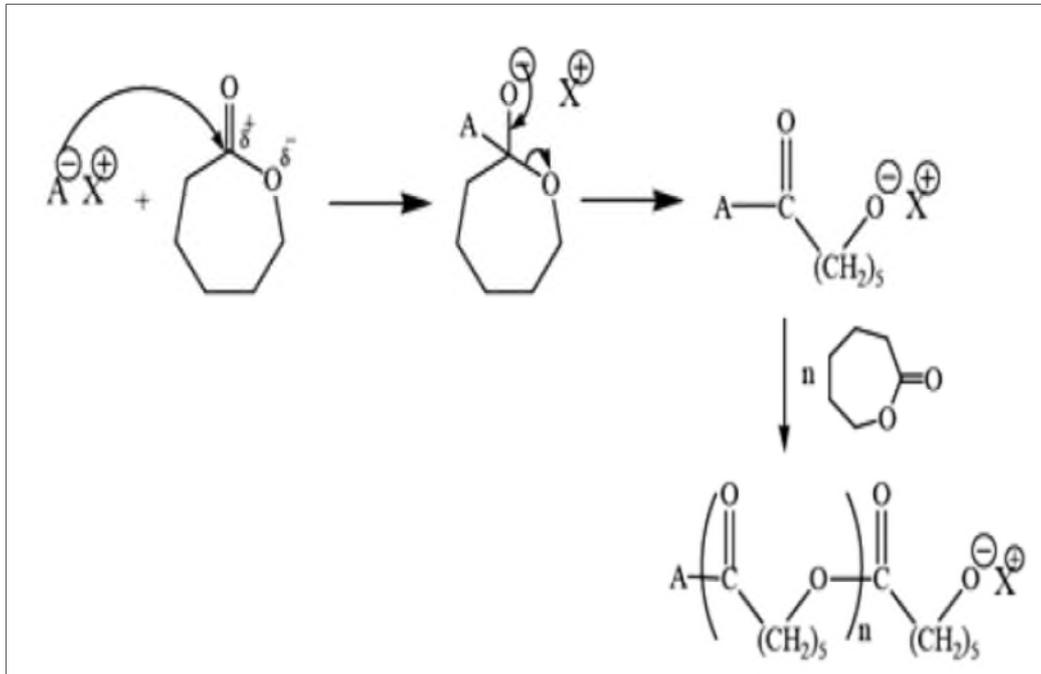


Figure I.8 : Mécanisme de polymérisation anionique par ouverture de cycle de l'é-caprolactone

I. 3. L'acide poly (lactique-co-glycolique) :

I. 3.1. Introduction :

PLGA est le plus populaire parmi les divers polymères biodégradables disponibles en raison de sa longue expérience clinique, des caractéristiques de dégradation favorables et des possibilités pour l'administration soutenue de médicament. Une littérature récente a montré que la dégradation du PLGA peut être utilisée pour une libération prolongée du médicament à des doses souhaitables par implantation sans procédures chirurgicales. De plus, il est possible d'ajuster les propriétés physiques globales de la matrice polymère-médicament en contrôlant les paramètres pertinents tels que le poids moléculaire du polymère, le rapport du lactide au glycolide et la concentration du médicament pour atteindre un dosage et un intervalle de libération souhaités en fonction du type de type médicament [21- 22].

I. 3.2. Définition :

Le Polyester PLGA est un copolymère d'acide poly-lactique (PLA) et d'acide poly-glycolique (PGA). Il s'agit du meilleur biomatériau disponible pour l'administration de médicaments en ce qui concerne la conception et la performance. L'acide poly-lactique contient un α - carbone asymétrique qui est typiquement décrit comme forme D ou L en termes stéréochimiques classiques et parfois sous forme R et S, respectivement. Les formes énantiomères du polymère PLA sont l'acide poly D-lactique (PDLA) et l'acide poly L-lactique (PLLA). PLGA est généralement un acronyme pour l'acide poly D, L-lactique- co-glycolique où les formes d'acide D- et L-lactique sont dans un rapport égal.

I. 3.3. Propriétés physico-chimiques de l'acide poly (lactique-co-glycolique) :

Le PLGA est un hétéro copolymère d'acide lactique et d'acide glycolique obtenu par réaction de co-polymérisation. Les monomères sont liés par des liaisons ester et il en résulte un polyester aliphatique linéaire (Figure I.9) [23].

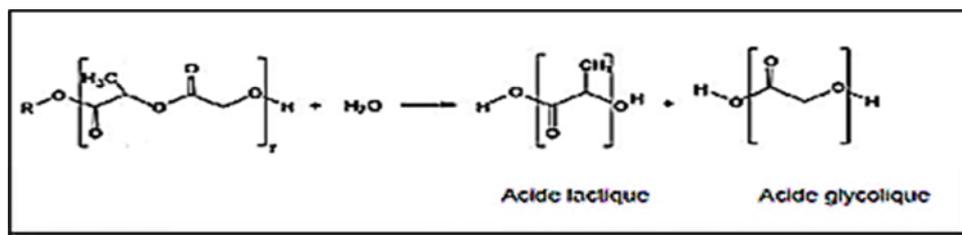


Figure I.9: Structure de l'acide poly(lactique-co-glycolique) avec x et y le ratio de monomères d'acide lactique et d'acide glycolique, respectivement

L'acide lactique contient un carbone asymétrique rendant la molécule chirale avec deux énantiomères : D- et L- acide lactique. Le PLGA contient généralement la forme L et D en proportion égale ; il s'agit donc d'acide poly D,L-lactique-co-glycolique. En fonction du rapport de lactide / glycolide utilisé pour la polymérisation, différentes formes de PLGA peuvent être obtenues (ex : PLGA (75 / 25), PLGA (50 / 50)...). Les propriétés physiques du polymère tel que son poids moléculaire ont une influence sur la résistance mécanique du polymère et son aptitude à être destiné pour la formulation de systèmes à libération contrôlée. La présence du groupement méthyl dans l'acide lactique le rend moins hydrophile que l'acide glycolique, et par conséquent un PLGA riche en acide lactique sera plus hydrophobe, absorbera moins d'eau et par la suite se dégradera plus lentement [24].

Le PLGA se dégrade par hydrolyse des liaisons ester, en présence d'eau. Le temps nécessaire à la dégradation est lié à la proportion des monomères utilisés lors de la production du polymère: plus la teneur en acide glycolique est élevée, plus la dégradation est rapide. Une exception à cette règle, le PLGA avec un ratio (50 / 50) d'acide lactique et d'acide glycolique s'hydrolyse plus rapidement que ceux qui contiennent une proportion plus élevée de l'un des deux monomères et se dégrade en environ 50 à 60 jours [25]. Le PLGA peut être solubilisé dans une large gamme de solvants organiques, y compris les solvants chlorés, tétrahydrofurane, acétone ou l'acétate d'éthyle [26]. Sa solubilité dans les solvants organiques est un facteur important en ce qui concerne sa formulation en tant que système de libération de SA. Tous les PLGA sont amorphes et caractérisés par une température de transition vitreuse (T_g) qui correspond au passage du polymère d'un état vitreux à un état caoutchouteux [27].

Cette dernière est généralement supérieure à la température physiologique de 37 °C. Le polymère a des propriétés viscoélastiques dépendantes de la température extérieure (T) :

- Si $T < T_g$: le polymère est sous forme vitreuse
- Si $T > T_g$: le polymère est sous forme caoutchouteuse

L'état caoutchouteux est caractérisé par une mobilité moléculaire élevée et par conséquent, il est plus susceptible de subir des changements physiques et chimiques que l'état vitreux. La T_g d'un polymère sous forme vitreuse peut être diminuée lorsqu'il est mélangé à d'autres substances dites plastifiantes. Cela conduit à une augmentation de la mobilité des chaînes polymériques et influençant ainsi les cinétiques de libération de SA encapsulée à partir des systèmes à base de PLGA [27].

L'eau est connue pour jouer le rôle de plastifiant pour le PLGA [28]. En revanche, lorsque la T_g peut être augmentée par l'addition d'une SA, le phénomène est considéré comme anti-plastifiant [29]. Il a été rapporté dans la littérature que la T_g du PLGA diminue avec la diminution de la teneur en acide lactique dans la composition du copolymère ainsi que la diminution du poids moléculaire [28]. La capacité de gonflement et d'hydrolyse, et par la suite la vitesse de dégradation du PLGA sont directement influencées par la cristallinité du polymère [30]. La résistance mécanique du PLGA est affectée par les propriétés physiques telles que son poids moléculaire et son indice de polydispersité.

I. 3.4. Biodégradabilité et biocompatibilité de l'acide poly (lactique-co-glycolique) :

La conception et la formulation des systèmes biodégradables d'administration de SA exigent une bonne compréhension des phénomènes de biodégradation ainsi que les réponses cellulaires et tissulaires qui déterminent leur biocompatibilité [31]. Le PLGA est l'un des polymères biodégradables les plus utilisés. Il subit, dans le corps, une hydrolyse en milieu aqueux pour produire de l'acide lactique et de l'acide glycolique, deux métabolites solubles dans l'eau [32] (Figure I.10)

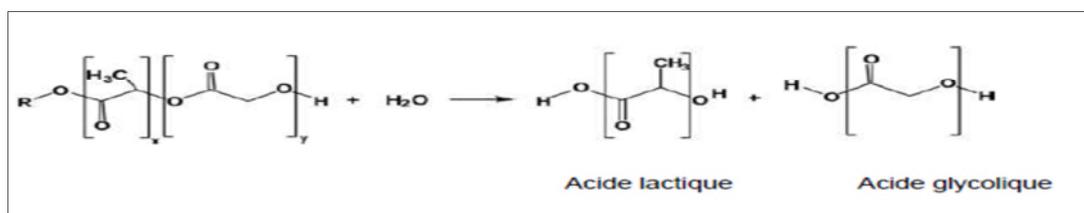


Figure I.10: Hydrolyse de l'acide Poly(lactique-co-glycolique).

L'acide lactique est un produit du métabolisme anaérobie du corps humain qui est incorporé par la suite dans le cycle de l'acide tricarboxylique, métabolisé et éliminé sous forme de dioxyde de carbone et d'eau [33]. L'acide glycolique est, soit excrété sous forme inchangée par voie rénale, soit il pénètre dans le cycle de l'acide tricarboxylique et est éventuellement éliminé sous forme de dioxyde de carbone et d'eau [34]. Les produits de dégradation sont formés à un rythme très lent et par conséquent ils n'affectent pas la fonction cellulaire puisque le corps traite efficacement ces deux monomères. Ainsi, ils représentent une toxicité systémique minimale associée à l'utilisation de MP de PLGA comme système de libération de PA [35].

Les substances thérapeutiques encapsulées dans des systèmes matriciels à base de PLGA sont libérées à une vitesse contrôlée grâce à la diffusion de ces dernières et à la dégradation de la matrice polymérique [36]. Le rôle des enzymes dans la biodégradation du PLGA est controversé. Il a été rapporté dans la littérature que l'hydrolyse spontanée était le seul mécanisme de dégradation de ce type de système [37,38]. D'autres travaux ont indiqué que la biodégradation du PLGA n'implique aucune activité enzymatique et se fait purement par hydrolyse. Il a été conclu que seule une faible implication des enzymes est attendue dans les premiers stades de dégradation avec des polymères à l'état vitreux, tandis que les enzymes

peuvent jouer un rôle important dans la dégradation des polymères à l'état caoutchouteux. Cela était basé sur les différences observées entre les taux de dégradation *in vivo* et *in vitro* [39,40,41].

I. 3.5. Les facteurs influençant la libération de substances actives et la dégradation du polymère :

Pour améliorer les propriétés du dispositif de libération de PA à base de PLGA, il est essentiel de comprendre les facteurs qui affectent la dégradation du PLGA pour concevoir un dispositif efficace. Parmi ces facteurs :

I. 3.5.a) Effet de la composition :

La composition de polymère est le facteur le plus important pour déterminer l'hydrophilie et le taux de dégradation d'une matrice de distribution qui influencent la vitesse de dégradation. Une étude systématique de la composition du polymère avec sa dégradation a été démontrée par de nombreux groupes [42,43].

Ces résultats montrent que l'augmentation du pourcentage d'acide glycolique dans les oligomères accélère la perte de poids du polymère. PLGA 50:50 (PLA / PGA) présente une dégradation plus rapide que PLGA 65:35 en raison de la dégradation préférentielle de la proportion d'acide glycolique attribuée par une plus grande hydrophilie. Par la suite, PLGA 65:35 montre une dégradation plus rapide que PLGA 75:25 et PLGA 75:25 que PLGA 85:15 [44]. Ainsi, la valeur absolue de la vitesse de dégradation augmente avec la proportion d'acide glycolique. La quantité d'acide glycolique est un paramètre critique pour ajuster l'hydrophilie de la matrice et donc la dégradation et la vitesse de libération du médicament.

I. 3.5.b) Effet du poids moléculaire moyen (M_w) :

Les polymères à poids moléculaire plus élevé ont généralement présenté des taux de dégradation plus faibles [45]. Le poids moléculaire a une relation directe avec la taille de chaîne du polymère. Les polymères ayant un poids moléculaire plus élevé ont des chaînes polymères plus longues, qui nécessitent plus de temps pour se dégrader que de petites chaînes polymères. Cependant, ceci est opposé pour PLA en raison d'un degré de cristallinité inversement proportionnel avec le poids moléculaire [45,46].

I. 3.5.c) Effet de la taille et de la forme de la matrice :

Le rapport entre la surface et le volume s'est révélé être un facteur important de dégradation des gros dispositifs. Un rapport de surface plus élevé conduit à une dégradation plus grande de la matrice. Il a également été rapporté que la dégradation en vrac est plus rapide que la dégradation pure de surface pour le PLGA, ce qui rend la libération du médicament plus rapide à partir des dispositifs avec une surface plus élevée au volume [47, 48,49].

I. 3.5.d) Effet des enzymes :

Des résultats contradictoires ont été publiés sur l'effet des enzymes sur les mécanismes de dégradation (hydrolytique *versus* clivage enzymatique) en partie à cause des observations selon lesquelles la dégradation *in vivo* ne peut pas être entièrement corrélée à l'évaluation *in vitro* [50]. Il a été proposé que le PLGA se dégrade principalement par dégradation hydrolytique, mais il a également été suggéré que la dégradation enzymatique peut jouer un rôle dans le processus. En raison d'un manque d'uniformité dans les tests *in vivo* , il est difficile de comparer et de démontrer le choix des enzymes proposées et leur contribution dans le processus de dégradation [51 , 52].

I. 3.5.e) La cristallinité et la température de transition vitreuse :

La composition du copolymère affecte également les propriétés physiques du polymère telles que la Tg et la cristallinité, qui ont des effets indirects sur la vitesse de dégradation. Lorsque le polymère est à l'état amorphe, la PA peut diffuser plus rapidement que lorsqu'il est à l'état cristallin. Cela est dû à la plus grande mobilité des chaînes polymériques à l'état amorphe. Un polymère cristallin est plus rigide et donc la diffusion de la PA est ralentie. A l'état humide, la Tg du PLGA peut devenir inférieure à 37 °C, ce qui augmente la mobilité des chaînes polymériques et accélère la libération de la PA.

I. 3.5.f) L'effet du pH :

Le pH acide peut être utilisé pour accélérer la libération des PA à partir de MP de PLGA [53]. Zolnik *et al.* ont conclu qu'un pH inférieur n'a pas d'influence sur le «burst», mais en a une sur l'évolution de la morphologie pendant la libération. A pH 7,4, la morphologie des MP montrent la création de pores en raison de l'effet autocatalytique. A pH

2,4, la surface extérieure est restée lisse tout au long de la libération et est devenue très fragile, ce qui provoque parfois leur rupture. Cela peut être expliqué par le fait que les oligomères formés ont une faible solubilité à pH 2,4 et, par conséquent, ils restent à l'intérieur de la particule.

I. 3.5.g) La nature de la substance active :

Les acides ainsi que les bases peuvent catalyser le clivage des liaisons esters. Le PA en elle-même peut subir des interactions avec le polymère, ce qui entraîne une libération plus lente. Le PLGA contient des extrémités carboxyliques libres, qui sont chargées négativement à pH physiologique de 7,4. Si une SA basique est incorporée dans les MP, elle sera chargée positivement à pH physiologique. Par conséquent, la charge négative des extrémités carboxyliques fera l'objet d'une interaction ionique avec la charge positive de la molécule. Par conséquent, la diffusion sera entravée et la libération sera ralentie.

Chapitre 2 :

Etude bibliographique

« Microencapsulation
& L'activité
antibiotique »

Partie A : Microencapsulation

II. 1. Introduction :

La microencapsulation regroupe l'ensemble des procédés conduisant à l'obtention de microcapsules. Les microcapsules sont généralement sphériques, creuses (réservoir) ou solides (matrice) et servent à contenir de nombreux types de produits solides ou liquides. Historiquement, l'une des premières et plus importantes applications a été la fabrication de microcapsules colorantes pour le papier autocopiant qui a permis de remplacer l'ancienne feuille de carbone en 1950. Depuis, la microencapsulation a intéressé de nombreuses industries parmi lesquelles on peut citer la pharmacie, les cosmétiques, l'agroalimentaire, l'agrochimie, le textile, [1]

L'encapsulation dans des microcapsules pour des compositions selon la présente invention est particulièrement intéressante pour des principes actifs instables, sensibles aux différents facteurs physico-chimiques environnants tels que la température, le pH, l'oxygène, la présence d'agents oxydants ou de métaux lourds ou la lumière et le rayonnement UV [2].

II. 2. Caractéristiques générales des microparticules :

II. 2.1. Structure et taille :

Une microcapsule est constituée d'une enveloppe entourant une substance à transporter (Figure II.1). Elle est composée de deux parties : des substances à encapsuler, comme des cristaux, des solutions ou des émulsions ; et une membrane qui protège les substances à encapsuler et contrôle leur libération. Elle présente une taille comprise entre 1 et 1000 μm [3][4].

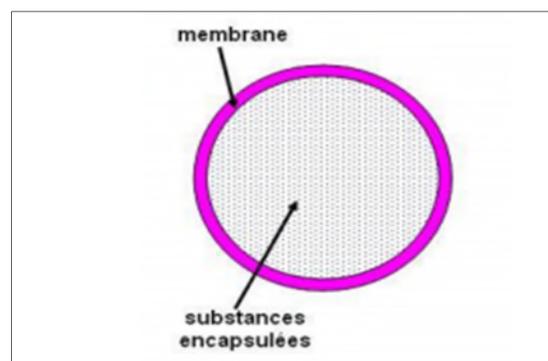


Figure II.1: Morphologie d'une microcapsule.

Chapitre II

La morphologie des microparticules peut être observée par microscopie optique ou électronique. Deux structures peuvent exister [5]:

II. 2.1.a) Les systèmes réservoirs (microparticules) :

Les microparticules sont des structures réservoirs, sphériques, à paroi polymère et comportant un cœur hydrophile ou lipophile. Le principe actif est généralement dissous dans le cœur mais peut également être adsorbé à la surface des nanoparticules. (Figure II.2-a)

II. 2.1.b) Les systèmes matriciels (microsphères) :

Les microsphères sont des structures matricielles de forme sphérique constituées d'un réseau polymère. Le principe actif est soit dispersé dans le réseau polymère durant la formation des microsphères, soit adsorbé à la surface de ces particules après préparation par l'intermédiaire de liaisons de type hydrophobes, électrostatiques ou covalentes. (Figure II.2-b)

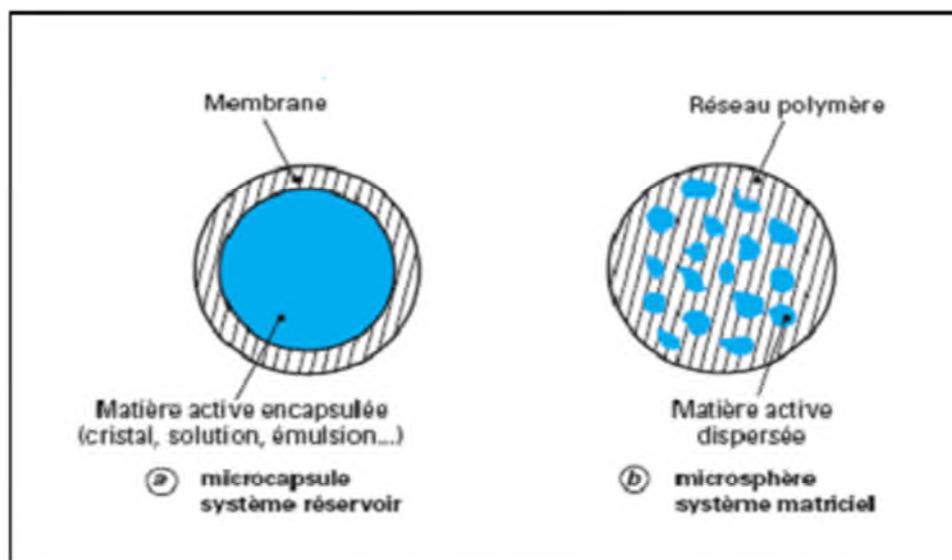


Figure II.2 : Représentation schématique des différentes formes de microcapsules.

II. 3. Les facteurs influençant la morphologie des microparticules :

II. 3.1. Les paramètres de composition :

- La concentration initiale de matière active et de polymère
- La quantité de la phase organique et la phase aqueuse
- Le type et la concentration du tensioactif
- La viscosité des phases utilisées.

- La nature et le volume de solvant utilisé.
- Le volume de la aqueuse.

II. 3.2. Les paramètres de formulation (physico-chimique de procédé) :

- La température et le PH pendant la production.
- La vitesse de l'agitation.
- La configuration du réacteur (type d'agitation).
- La technique de formulation.

II. 4. Les différents procédés de microencapsulation :

Les microparticules peuvent être obtenues de plusieurs façons, suivant la taille désirée et les propriétés physico-chimiques du principe actif encapsulé. On distinguera trois grandes familles de procédés d'obtention [6][7] :

- Procédés physico-chimiques;
- Procédés chimiques;
- Procédés mécaniques.

Il existe plusieurs modes de classification de ces procédés selon différents critères :

- L'utilisation ou non de solvant,
- La nature du milieu dispersant : liquide, gazeux ou à l'état supercritique,
- L'utilisation des polymères préformés, de lipides ou de monomères,
- Le type de microparticule obtenue.

II. 4.1. Procédés physico-chimiques :

II. 4.1.a) Technique de coacervation :

Les techniques de coacervation s'appliquent à des solutions colloïdales de substances macromoléculaires, le terme coacervation décrivant un changement de solubilité des solutions de colloïdes [8].

Le procédé d'encapsulation par coacervation est décrit dans la figure II-3. La première étape consiste à disperser le produit à encapsuler dans une solution colloïdale (étape 1). Puis, on modifie la solubilité du colloïde (étape 2) [2] [9] :

Les substances macromoléculaires devenant moins solubles se regroupent pour former des gouttelettes appelées coacervats. Ces gouttelettes riches en polymère se regroupent autour de la substance à encapsuler pour former un enrobage continu (étape 3). Elles coalescent pour former un film solide continu. Puis, il y a un renforcement de la membrane par réticulation du polymère (étape 4) [2].

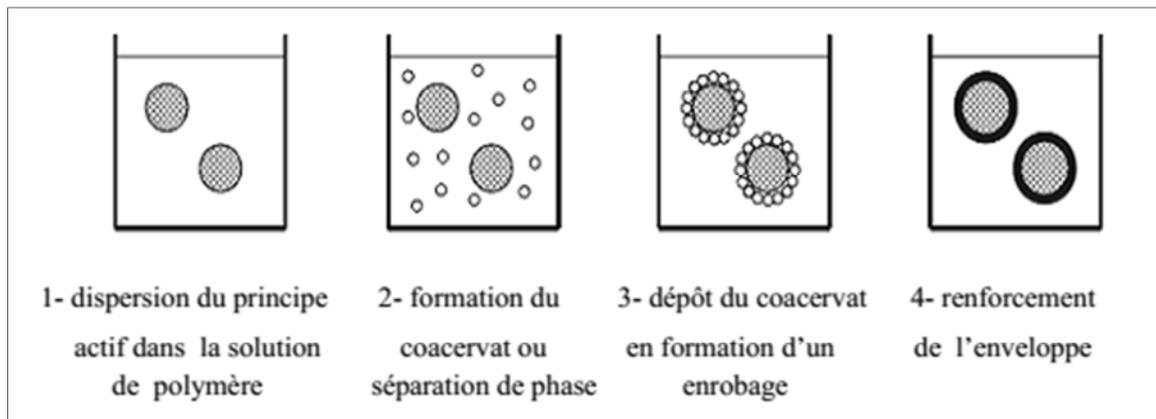


Figure II.3 : Principe de l'encapsulation par coacervation.

II. 4.1.b) Technique par fusion à chaud du polymère :

Le principe actif est dispersé dans le polymère fondu à une température supérieure à son point de fusion. (Figure II.4).

La solidification des microsphères est ensuite réalisée par ajout à basse température d'une phase dispersante appropriée. Les sphères sont filtrées, séchées et tamisées [5][10]. Les limites de cette méthode sont qu'on ne peut l'appliquer qu'aux principes actifs thermostables et aux matériaux lipidiques.

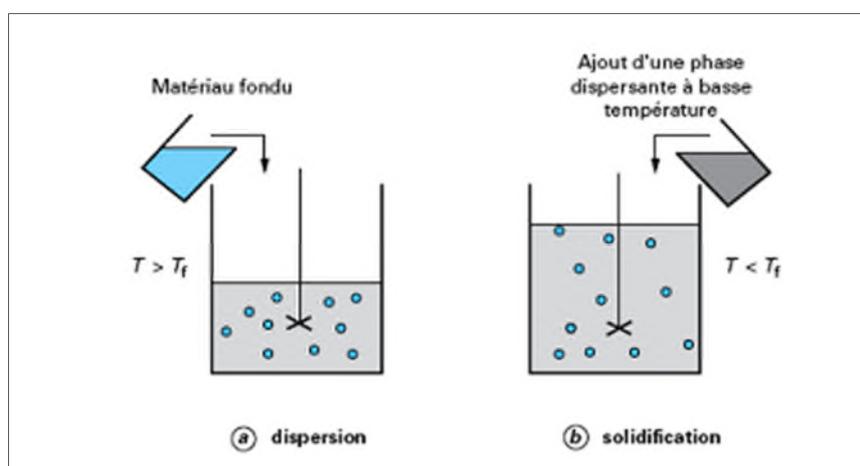


Figure II.4 : Préparation des microsphères par fusion à chaud [5].

II. 4.1.c) Technique par évaporation ou extraction du solvant organique :

A l'échelle du laboratoire, la technique la plus fréquemment utilisée est la « Méthode du bécher » illustrée en figure II.5. A titre d'exemple, principales étapes de préparation des microparticules utilisant des émulsions eau dans huile dans eau (E/H/E) sont montrées :

- Le principe actif est soit dispersé ou dissout dans la phase aqueuse interne ;
- Cette dernière est émulsifiée dans une solution organique du polymère qui formera la matrice. La formation des gouttelettes est causée par une agitation mécanique, par exemple au moyen d'une pâle ;
- L'émulsion eau dans huile (E/H) ainsi obtenue est ensuite dispersée dans une phase aqueuse externe résultant en une émulsion eau dans huile dans eau (E/H/E). A nouveau, la formation des gouttelettes est provoquée par agitation mécanique, par exemple au moyen d'une pâle. Dès que le solvant organique entre en contact avec la phase aqueuse externe, il diffuse dans cette dernière.

Le solvant organique migre ensuite à la surface de l'émulsion E/H/E par convection et diffusion, où il s'évapore. Ainsi, la concentration du solvant organique dans la phase intermédiaire diminue au cours du temps. Au dessous d'une concentration critique donnée, le polymère commence à précipiter, encapsulant alors le principe actif. Les microparticules sont formées. Etant donné que les étapes (1)-(3) sont toutes réalisées dans des béchers, cette méthode de préparation est appelée la « Méthode du bécher ».

Par la suite, les microparticules sont séparées par filtration et séchées. Le principe de ce procédé est représenté sur la figure II.5.

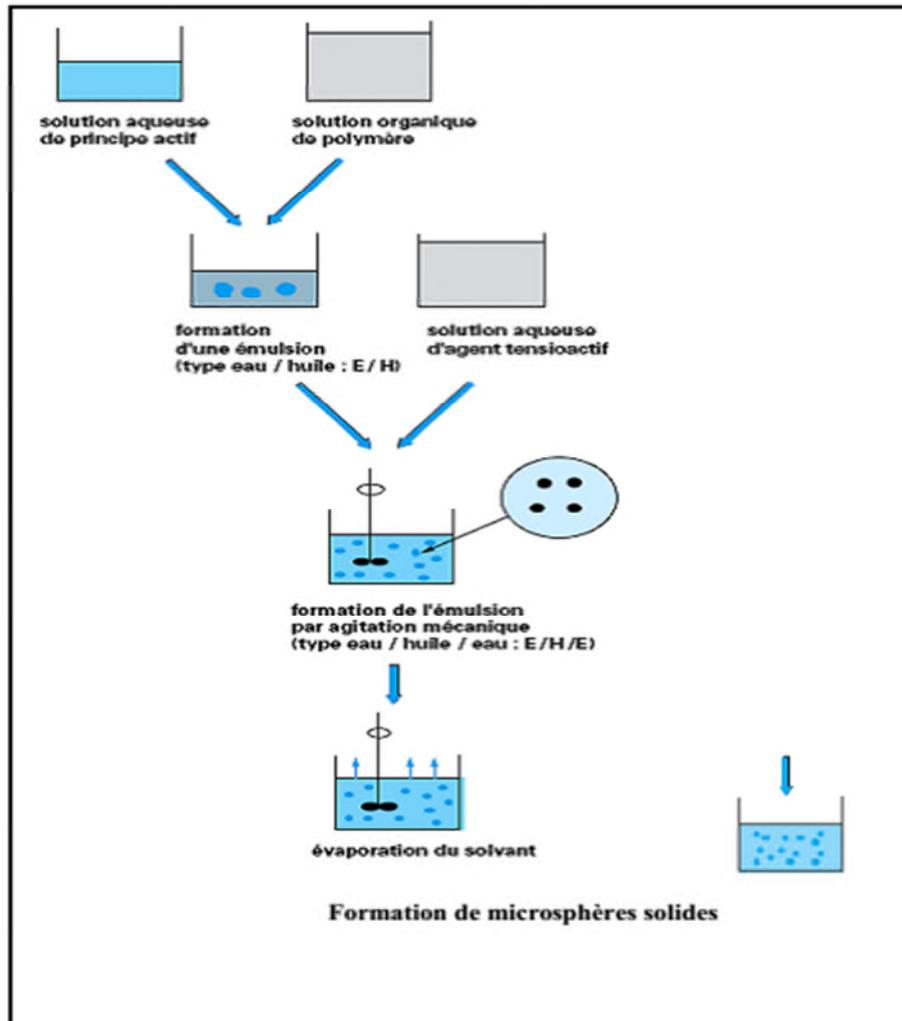


Figure II.5: Procédé de microencapsulation par évaporation de solvant à partir d'une émulsion E/H [5].

Un des principaux avantages de cette technique est qu'elle ne nécessite pas d'équipements onéreux. En revanche, la transposition à grande échelle peut être problématique (en particulier du fait que le ratio volume/surface est un facteur très important à respecter) et la distribution de taille des microparticules est souvent assez large.

II. 4.2. Procédés chimiques :

II. 4.2.a) Encapsulation par polymérisation interfaciale :

La caractéristique de cette technique est le fait que l'enveloppe est formée à la surface d'une goutte ou particule par polymérisation de monomères. Elle repose sur le concept suivant :

Deux monomères réactifs X et Y présents séparément dans deux phases non miscibles vont réagir à l'interface pour donner un polymère qui constituera la paroi de la capsule [12].

Dans les conditions idéales où chacun des monomères est présent dans une seule des deux phases, la réaction de polymérisation démarre nécessairement à l'interface et forme la première pellicule protectrice des microparticules appelée membrane primaire. Ensuite par diffusion des monomères à travers la première pellicule, la réaction de polymérisation continue. En pratique, il peut exister un coefficient de partage des monomères dans chacune des deux phases, des oligomères peuvent donc se former à l'intérieur des gouttelettes. Deux situations extrêmes peuvent se produire, ce qui explique l'obtention possible de microsphères ou microcapsule (Figure II.6) [11][13].

- Les premières oligomères formées sont très solubles dans les gouttelettes ; par conséquent, ils croissent dans les gouttes jusqu'à former une matrice polymère solide formant ainsi des microsphères.
- Les oligomères initialement formés sont insolubles dans les gouttelettes de substance à encapsuler ; lorsqu'ils grandissent, ils précipitent à l'interface de la particule dispersée et forment la membrane protectrice autour des gouttelettes conduisant ainsi à des microcapsules [11].

La taille des microcapsules obtenues par polycondensation interfaciale est comprise entre environ 0,5 μm et 100 μm . Les exemples d'applications industrielles de cette technique sont particulièrement nombreux dans le domaine phytosanitaire, pour la production de microcapsules d'insecticides, d'herbicides et de fongicides avec des membranes de polyamide, polyurée ou polyuréthane. Pour l'ensemble de ces produits, la toxicité des microcapsules est au moins 10 fois inférieure à celle des concentrés émulsionnables correspondants, les pertes par volatilisation sont fortement réduites et l'efficacité est nettement prolongée, sans réduction de l'activité biologique (insecticide, herbicide) [5].

Un autre domaine d'utilisation de cette technique est celui de l'encapsulation de molécules biologiques telles que les protéines (uréase, arginase, histidase, glucose oxydase, hémoglobine et anticorps).

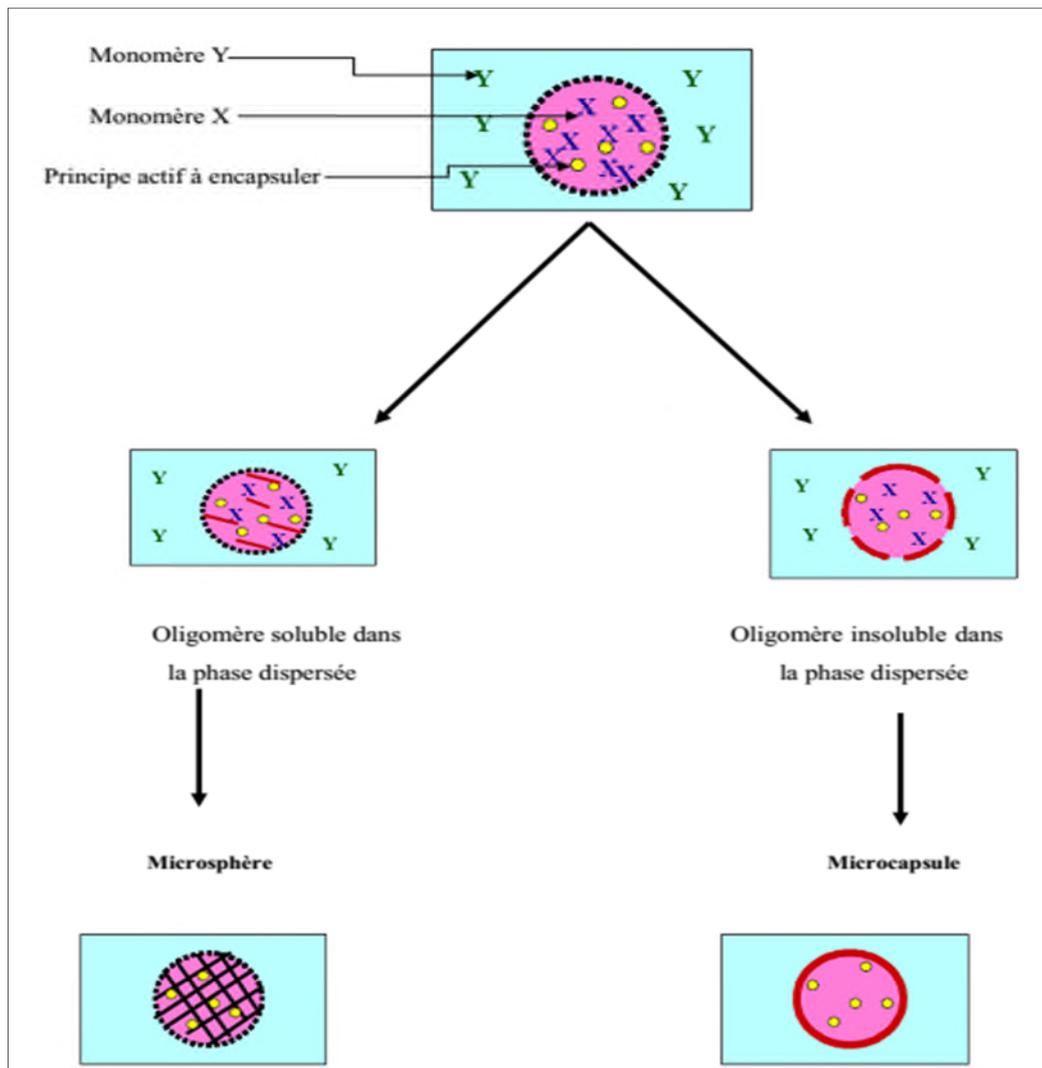


Figure II.6 : Mécanisme de formation des microparticules par polymérisation interfaciale.

II. 4.3. Procédés mécaniques :

II. 4.3.a) Atomisation (spray-drying) :

Cette technique comporte la dispersion de la substance active dans un matériau d'enrobage, suivi de la pulvérisation du mélange dans une chambre de dessiccation. La pulvérisation s'effectue soit par passage à travers une buse d'atomisation, soit par un système de type disque tournant ou buse rotative. Les capsules produites sont collectées à la base de la chambre de dessiccation après séparation du flux d'air par passage dans un cyclone [7][14].

II. 4.3.b) Séchage en lit fluidisé:

Le séchage en lit fluidisé s'applique à des matières actives constituées de particules solides (granulés, cristaux). Des matières actives liquides peuvent néanmoins être encapsulées après absorption par des supports particulaires poreux.

Le procédé permet de réaliser un enrobage continu de particules qui conduit donc à la production de microcapsules. Elle comporte trois étapes. D'abord, les particules à enrober sont fluidisées dans l'atmosphère chaude de la chambre cylindrique verticale d'un lit fluidisé. Ensuite, le matériau d'enrobage est pulvérisé par une buse sur les particules du principe actif (Figure II.7).

Les petites gouttelettes du liquide pulvérisé rentrent en contact avec la surface des particules et se coalescent entre elles. Le solvant ou le mélange est alors évaporé par un air chaud et le matériau enduisant adhère sur les particules. La taille des capsules varie de 0,3 à 10 millimètres [5].

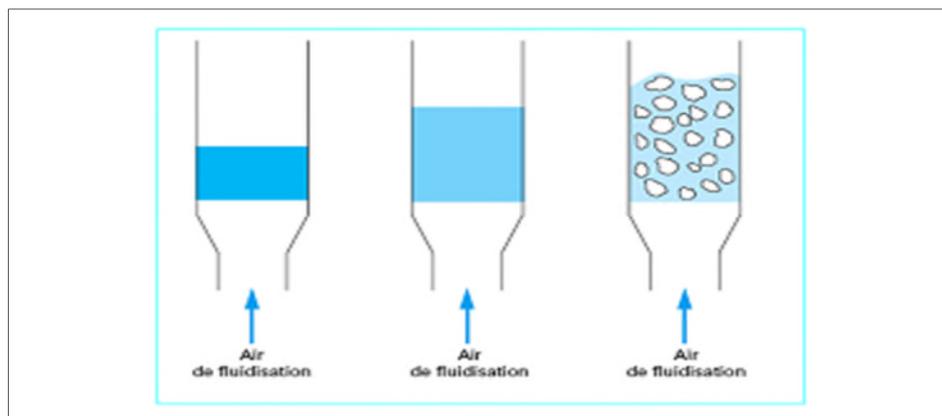


Figure II.7 : Différentes étapes de la fluidisation

II. 5. Application de la microencapsulation :

La microencapsulation a été développée et appliquée dans des domaines variés [7][11] :

- **Domaine pharmaceutique:** Les microcapsules sont principalement conçues pour contrôler la durée de la libération du principe actif. Elles sont véhiculées dans le corps, puis par la dispersion et l'infiltration du médicament vers l'endroit ciblé, une concentration propre et une durée spécifique de la libération permettent de donner pleinement les effets du médicament.

- **Domaine cosmétique:** des microcapsules ont déjà été intégrées dans différentes crèmes, des shampooings, ou des gels, afin de prolonger la stabilité chimique et microbiologique du principe actif.
- **Domaine agro-alimentaire:** la microencapsulation est principalement utilisée pour des additifs alimentaires, tels que des arômes, des édulcorants, des colorants,... etc.
- **Domaine textile:** les microcapsules peuvent rendre des textiles hydratants, désinfectants, parfumés,... etc. Récemment des tissus contenant des microcapsules à base de paraffine permettent d'ajuster automatiquement la température en fonction de la chaleur du corps humain.

Partie B : L'activité antibiotique

II. 1. Introduction :

Les bactéries sont des organismes microscopiques de différents types. Elles présentent une paroi cellulaire, chimiquement distincte, qui lui confère une forme particulière : sphérique, en bâtonnet ou en spirale. Les bactéries se multiplient par division cellulaire, processus qui peut se produire toutes les 20-30 minutes. Ainsi, une seule bactérie qui pénètre dans l'organisme et qui s'y multiplie à ce rythme, peut engendrer jusqu'à 30 milliards et plus, de nouvelles cellules, en 12 heures. Heureusement, la plupart des bactéries sont inoffensives et certaines sont essentielles, comme celles qui sont présentes dans l'intestin et qui facilitent la digestion. Mais une minorité d'entre elles, dites pathogènes, engendrent des maladies. Les maladies infectieuses causées par les bactéries pathogènes représentent un problème de santé publique reposant principalement sur l'usage des antibiotiques, en espérant que leurs effets antibactériens seraient capables de lutter contre ces agents pathogènes. Mais ces dernières années on assiste à l'émergence de souches multi-résistantes dans plusieurs régions du monde.

Ainsi, afin de valoriser certains dérivés de l'allopurinol préparés précédemment, il nous a paru intéressant d'étudier leur sensibilité antimicrobienne sur des souches bactériennes pathogènes. En effet, il a été montré que les dérivés de l'allopurinol ont une activité antiparasitaire,[15] antivirale[16-17].

II. 2. Micro-organismes utilisés :

La souche utilisée dans cette étude est constituée de souches bactériennes appartenant à la collection des souches de l'INH, elles sont conservées au Département de Bactériologie Médicale de l'INH et ont été isolées à partir des différents liquides biologiques des patients. Elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance, on les utilise entre autres pour le criblage des substances naturelles ou de synthèse à effet antimicrobien. Les tests sont réalisés sur quatre souches bactériennes. Dans notre travail nous avons retenu les espèces suivantes:

➤ *Escherichia coli* ATCC25922, autrement appelée colibacille ou *E. coli* : est une bactérie intestinale des mammifères très commune chez l'être humain. Découverte en 1885 par Théodore Escherich, dans des selles de nourrissons, c'est un coliforme fécal généralement commensal. Cependant, certaines souches d'*E. coli* peuvent être pathogènes. *E. coli* est un

bacille gram négatif de la famille des entérobactéries. C'est un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud.

➤ *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853*, autrement connue sous le nom de bacille pyocyanique, est une bactérie du genre *Pseudomonas*. Elle est pathogène et fréquemment rencontrée dans les infections nosocomiales. Les formes de pathologie qu'elle engendre sont diverses : infection de l'œil, des plaies ou des brûlures, des urines, des poumons... Le *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie très robuste, naturellement très résistante aux antibiotiques et s'adaptant rapidement aux attaques médicamenteuses.

➤ *Staphylococcus aureus ATCC 25923*, est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées, et dans certains cas extrêmes, de septicémie. L'espèce *S. aureus* est commensale de l'homme et se révèle être pathogène opportuniste lorsque qu'elle se retrouve au mauvais endroit. *S. aureus* possède des pouvoirs pathogènes : notamment un pouvoir invasif, capacité à se multiplier et à se disséminer dans l'organisme; et un pouvoir toxique, capacité d'élaboration d'une toxine par la bactérie qui exerce à la fois des propriétés toxiques et antigéniques chez l'hôte.

II. 3. Les Antibiotiques :

Les antibiotiques sont des substances qui inhibent ou même détruisent spécifiquement les bactéries sans être toxiques pour l'hôte. Ils peuvent avoir une action toxique directe : bactéricide, ou empêcher le développement des microorganismes : action bactériostatique. Le but du traitement étant d'aider le système immunitaire à éliminer les bactéries pathogènes de l'organisme malade.

II. 3.1. Paramètres d'activité d'un antibiotique :

L'activité d'un antibiotique sur le germe peut être définie par différentes méthodes connues:

- Le spectre d'activité
- La concentration minimale inhibitrice (CMI)
- La concentration minimale bactéricide (CMB)
- L'index thérapeutique sérique
- Le temps d'antibiotique utile.

La CMI: concentration minimale inhibitrice étant la plus petite concentration

d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 heures d'incubation à 37°C, cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique.

II. 3.2. Méthodes d'étude de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques :

L'étude de la sensibilité d'une souche bactérienne aux antibiotiques consiste à mettre la bactérie en présence du ou des antibiotique (s) et à observer les conséquences sur le développement et la survie de la culture bactérienne. Il existe différentes méthodes [18,19] pour déterminer la sensibilité de la souche bactérienne aux antibiotiques :

- La méthode de dilution en milieu liquide.
- La méthode de dilution en milieu solide (gélose).
- La méthode de la diffusion sur gélose (antibiogramme).

II. 4. Techniques d'études in vitro du pouvoir antimicrobien :

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne. L'insolubilité de certains composés dans l'eau et d'une manière générale dans les milieux aqueux largement utilisés en microbiologie, est une explication de la variété des techniques. Selon la souche microbienne, les composés testés et l'application choisie, divers milieux de culture peuvent être mis en œuvre.

Les différents protocoles peuvent ainsi être classés :

- Selon le milieu dans lequel se fait la diffusion du composé, soit liquide, solide ou gazeux [20,21].
- Selon la nature du contact avec le germe : diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsionnant [22,23].

II. 4.1. Technique d'étude en vapeur :

C'est la technique des micro atmosphères rapportée par Beylier-Maurelen. Elle est employée spécialement pour mettre en évidence l'activité des produits chargés de composants volatiles comme les huiles essentielles. Son principe est d'ensemencer une boîte de Pétri avec les germes tests, tandis que l'on dépose quelques gouttes d'HE sur un papier filtre au fond et au centre du couvercle. La boîte est incubée couvercle en bas. Il se produit une évaporation

des substances volatiles et on lit après incubation, la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance.

II. 4.2. Technique d'étude sur milieu solide :

Cette technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou encore méthode des disques. Elle a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée pendant une cinquantaine d'années d'utilisation mondiale[24]. Il s'agit d'une méthode de diffusion en milieu gélosé coulé et solidifié en boîte de Pétri.

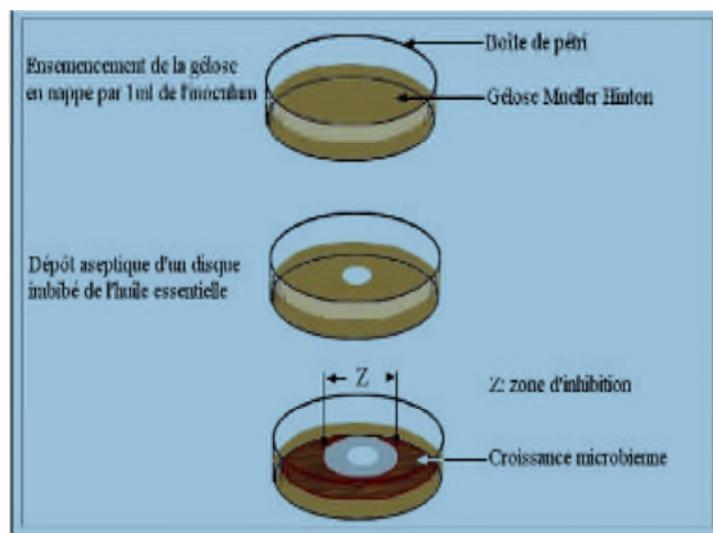


Figure II.8 : Illustration de la méthode de diffusion sur boîte Pétri (ZAIKI, 1988)

La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différents produits à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque antibiotique diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration suffisante en antibiotique pour inhiber leur croissance. On observe, ainsi, autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition.

Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique. Plus il est petit, plus elle est résistante. [25]

Une variation de cette technique a été rapportée par Tharib et al.[26], elle consiste en l'aménagement de cavités dans la gélose dans lesquelles sont versés les produits à tester. Elle a été indiquée dans les travaux de nombreux chercheurs (Deans et al. [27], Lis-

Balchin et al. [28] Burt et Reinders., [29] Faleiro et al. ,[30] Kunle et al.[31]).

Cette technique permet une bonne estimation du pouvoir antimicrobien, surtout pour les produits ayant une bonne diffusion dans le milieu solide.

Chapitre 3 :

Etude expérimentale

L'objectif de notre travail est l'étude de la cinétique de libération prolongée du médicament, on a envisagé de disperser une molécule active dans des matrices polymériques biodégradables différentes : PCL et PLGA.

Ce travail expérimentale comprend deux parties; la première partie est consacrée à la synthèse des microsphères à base de gélatine et de différents types de polymères biodégradables, caractérisés par différents techniques d'analyses: IR, UV-visible et DRX ;et l'étude cinétique de libération du principe actif (érythromycine) dans deux milieux physiologiques pH=1.2 et pH= 7.4 .

La deuxième partie comporte l'étude de l'activité antibiotique des microsphères sur différents souches bactériennes.

Partie A : Synthèses et Caractérisations

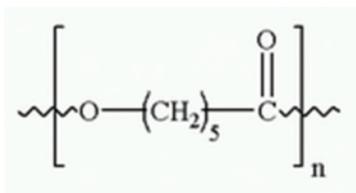
Dans cette partie on va expliquer :

- La synthèse par voie physico-chimique des microsphères à base d'un polymère biodégradable PCL et PLGA.
- Les caractérisations des microsphères par différentes méthodes d'analyses.
- L'étude cinétique de la libération de principe actif.

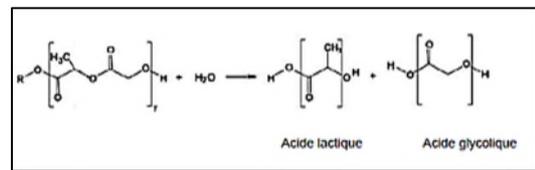
III. 1. Synthèse chimique des microsphères à base des polymères et la gélatine :

- Les polymères utilisés pour cette synthèse sont :

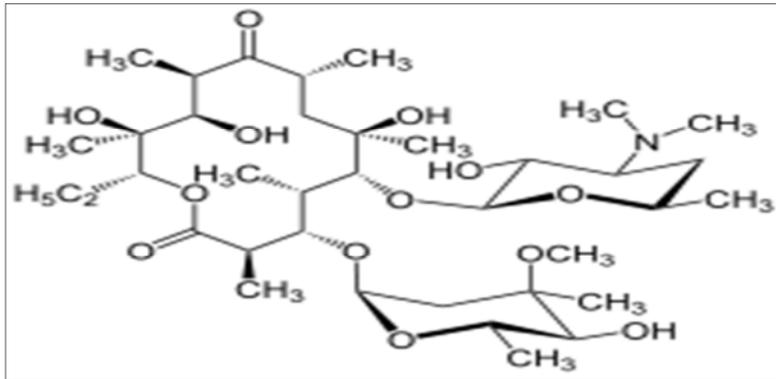
Polycaprolactone (PCL)



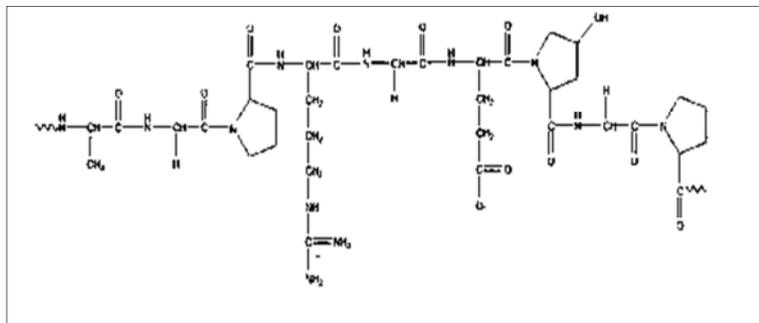
Poly (lactique-co-glycolique) acide



- Le principe actif utilisé est : érythromycine



- Le tensioactif utilisé c'est : la gélatine.



La synthèse des microsphères la plus simple c'est la technique par évaporation du solvant organique comme par exemple le dichlorométhane, acétone, le chloroforme ou bien alors un mélange de solvant.

III. 1.1. Identification des produits:

a. PCL :

La PCL est un polyester aliphatique synthétique, hydrophobe et biodégradable. C'est un polymère semi-cristallin, non toxique, obtenu par polymérisation d'ouverture de cycle du monomère ϵ -caprolactone:

La poly- ϵ -caprolactone utilisé pour la synthèse est d'origine commerciale

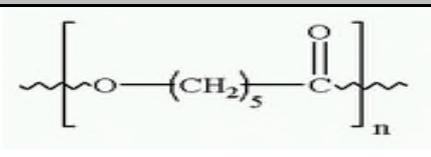
Nom	PCL
Masse moléculaire (g /mol)	80000
Structure chimique	
Masse volumique (g/cm ³)	1,11
Degré de polymérisation	500
Température de transition vitreuse (°C)	-55,-60
Température de fusion (°C)	55-65
Température de décomposition (°C)	300-350
Cristallinité (%)	67-68
Module d'Young (MPa)	26-42
Allongement à la rupture (%)	800-1100
Solubilité	Soluble dans le chloroforme, dichlorométhane, tétrachlorure de carbone, benzène, toluène, cyclohexane et 2-nitropropane. Peu soluble dans l'acétone, 2-butanone, acétate d'éthyle, et insoluble dans les alcools, les huiles, et éther diéthylique
Miscibilité et compatibilité	Miscible et compatible avec une grande variété des polymères comme PVC, PVA, ABS, SAN, PET...

Tableau III.1 : Propriétés physiques et chimiques de la PCL

b. PLGA:

PLGA est un copolymère qui est utilisé dans une foule de dispositifs thérapeutiques approuvés en raison de sa biodégradabilité et de sa biocompatibilité. Elle est synthétisée au moyen de la co-polymérisation par ouverture de cycle de deux monomères différents d'acide glycolique et d'acide lactique.

La cristallinité des PLGA varie de complètement amorphe à totalement cristalline en fonction de la structure du bloc et du rapport molaire. Les PLGA présentent généralement une température de transition vitreuse comprise entre 40 et 60 ° C. PLGA peut être dissous par une large gamme de solvants, selon la composition.

La PLGA utilisée pour la synthèse est d'origine commerciale avec le rapport molaire des monomères utilisés est 75:25

c. La gélatine:

La gélatine est une protéine d'origine animale, obtenue par hydrolyse partielle du collagène contenu dans les os et la peau des animaux. Elle est constituée de 84 à 90% de protéines et de 1% environ de sels minéraux, le reste étant de l'eau.

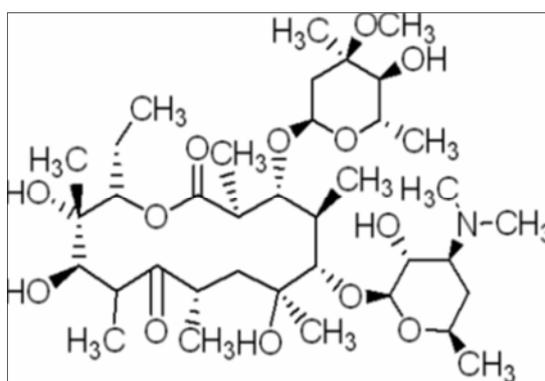
Nom	Gélatine
Spécificité organoleptique	Poudre blanche
Origine	Os ou peau acide d'origine porcine
Description Chimique	Protéine
Utilisations	Utilisée comme agent gélifiant, agent foisonnant ou de clarification, stabilisateur, émulsifiant, épaississant, liant,...
Solubilité	Gonfle dans l'eau froide, et entièrement soluble dans l'eau chaude.
Viscosité (sol à 6,67 à 60°C)	2,5 à 4 mPa
pH (solution à 6,67% à 45°C)	4,5 à 5,5

Tableau III.2 : Propriétés physiques et chimiques de la gélatine

d. L'érythromycine :

L'érythromycine est produite par une souche de *Streptomyces erythreus* est employée principalement contre les bactéries Gram+ et Mycoplasme d'où *E.Coli* et *Pseudomonas* sont relativement résistants au médicament. Bien que sa première utilisation remonte à 1952, c'est toujours l'un des antibiotiques macrolides les plus largement utilisés et qui s'est avéré être un traitement sûr et efficace pour traiter les infections à *Chlamydia*, la syphilis et la gonorrhée.

La structure chimique de l'érythromycine :



Apparence	Poudre blanche ou légèrement jaune ou cristaux incolores ou légèrement jaunes
Description des propriétés physiques	Légèrement hygroscopique, légèrement soluble dans l'eau mais moins soluble à plus haut températures, librement soluble dans l'alcool, soluble dans le méthanol, sensible à lumière.
pKa(constantededissociation)	8,8
Biodisponibilité	100%
Demi-vie (t_{1/2})	1,5 heure
Métabolisme	Hépatique

Tableau III.3 : Propriétés physiques et chimiques de ER.

Description des propriétés physiques :

Légèrement hygroscopique, légèrement soluble dans l'eau mais moins soluble à plus haut températures, librement soluble dans l'alcool, soluble dans le méthanol, sensible à lumière.

En vétérinaire médicament, L'érythromycine est utilisée pour le traitement de la mastite clinique et subclinique chez les vaches en lactation, Pour le traitement des maladies infectieuses causées par des bactéries sensibles à l'érythromycine et pour le traitement des maladies chroniques dues au mycoplasme chez les volailles.

Études pharmacocinétiques :**1) Absorption :**

La base d'érythromycine est détruite par l'acide gastrique, sauf si elle est administrée avec un entérique protecteur enrobage. Les médias acides dégradent rapidement l'érythromycine pour former des dérivés avec de petites antimicrobiennes activités. Le stéarate d'érythromycine est plus stable, mais des études in vitro ont démontré que le stéarate d'érythromycine se dissout dans l'acide gastrique, conserve seulement 2% d'activité antibiotique, et est rapidement détruit. Le site principal de L'absorption chez le rat, les chiens et les humains est l'intestin grêle. L'érythromycine n'est que légèrement absorbée par l'estomac. Chez l'homme, l'absorption se produit principalement dans le duodénum.

Chez l'homme, l'érythromycine est lentement absorbée après administration orale. Sérum de pointe Les concentrations se produisent de 1 à 6,3 heures après l'administration et varient de 0,1 à 4,8 µg / ml, selon la formulation et le revêtement d'érythromycine administré. L'absorption orale est inférieure à 50% et L'érythromycine est dégradée par l'acide gastrique. Il est absorbé dans l'intestin grêle en tant que base d'érythromycine.

La biodisponibilité orale de la base et des sels d'érythromycine non protégés est inférieure à 50% de la dose. Aliments Réduit l'absorption de l'érythromycine.

2) Métabolisme:

Le métabolisme de l'érythromycine a été étudié chez différentes espèces animales et chez les humains.

Ces études montrent que l'érythromycine est rapidement métabolisée dans le foie, principalement par une N-déméthylation processus chez les rats et les chiens et dans le système microsomique du foie des lapins.

Collectivement, Ces études suggèrent fortement que le métabolisme de l'érythromycine par la N-déméthylation se produit dans toutes les espèces testées. La Des-N-méthyl-érythromycine est le principal métabolite et la seule métabolite microbiologiquement actif de l'érythromycine. Toutefois l'activité antimicrobienne est probablement faible et la seule forme d'érythromycine connue pour être active in vivo est la base libre. C'est excrété dans la bile et éliminé par les fèces. Seule l'érythromycine a été trouvée dans le foie et l'absence de N-méthyl-érythromycine indique qu'il est excrété dans la bile immédiatement après la déméthylation de l'érythromycine.

Il est absorbé par le tractus intestinal, mais la quantité très minime de N-méthyl-érythromycine disponible dans le corps peut expliquer son absence à l'urine.

III. 1.2. Mode opératoire :

1) On prépare une solution aqueuse de gélatine à 1.5% en poids. On émulsionne dans cette solution dans 50 ml de dichlorométhane contenant 1g de PCL comme une solution organique à l'aide d'un agitateur mécanique (Heidolph RZP1) figure III.1 : (à gauche) pendant 3 heures, en maintenant la température à 40°C avec une vitesse 750 tour/min à l' aide d'une turbine d' agitation a 4 pales(à droite).



Figure III.1 : Dispositif expérimental.

Une fois le solvant DMC évaporé, on filtre les microsphères puis lavé avec l'eau distillée trois fois. Après séchage on a obtenu des microsphères de PCL la figure III.2 (M1) en utilisant le microscope optique (OPTIKA 4083.B1).



Figure III.2 : Observation des microsphères de PCL(M1) par microscope optique

L'analyse par microscope optique montre la forme des microparticules et la variété de leurs tailles des particules.

2) Le même protocole expérimental a été réalisé pour synthétiser les microsphères à base du PLGA(M2) la figure III.3 représente les microsphères obtenues

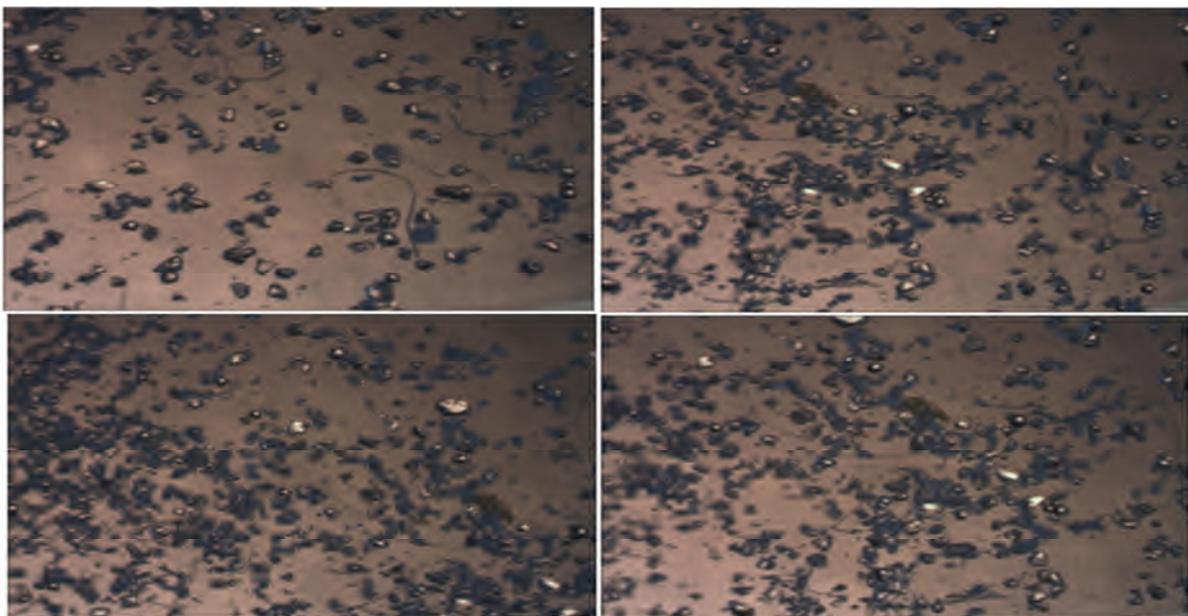


Figure III.3 : Observation des microsphères de PLGA(M2) par microscope optique

3) Pour la troisième synthèse on a un mélange de 0.5g de chaque polymère PCL et PLGA plus 0.2g du principe actif (érythromycine) dans 50ml de DMC.

La figure III.4 représente les microsphères obtenues

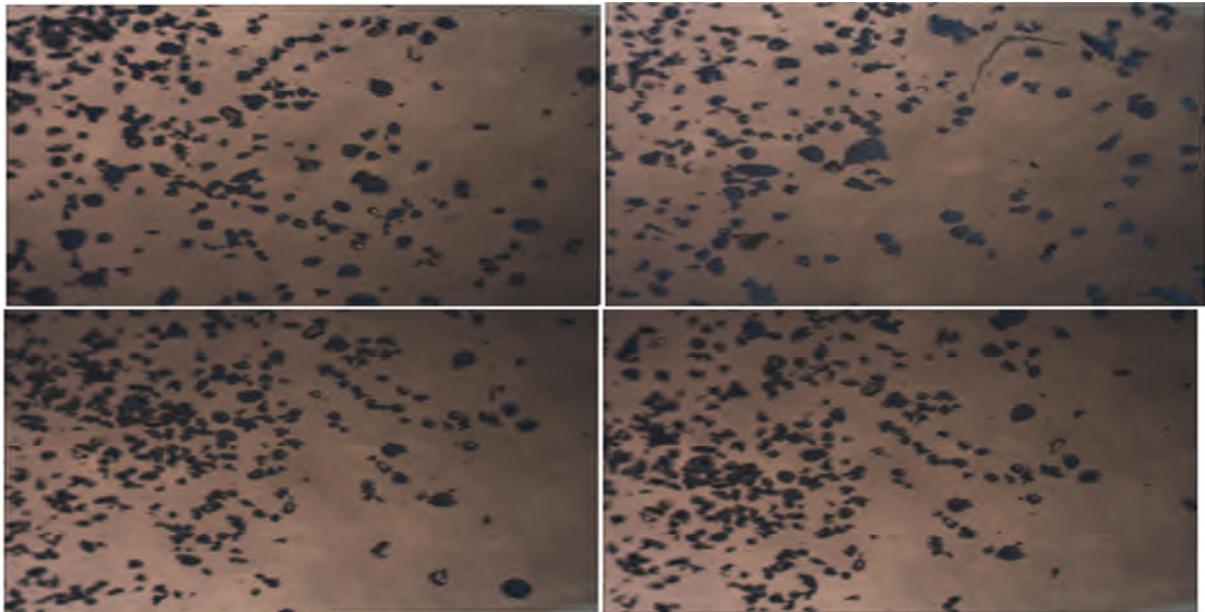


Figure III.4 : Observation des microsphères de PLGA et PCL (M3) avec ER par microscope optique

III. 2. Caractérisation des microsphères :

III. 2.1. Distribution de taille :

La connaissance de la taille et la distribution en taille des particules est essentielle pour la description des systèmes d'émulsion, les suspensions, et les poudres.

Cette caractéristique physique du système dépendante des conditions opératoires de fabrication 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 mono dispersé. 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 apparaître 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 sont calculés comme suit :

Si "i" est la classe des particules

"n_i" nombre de particules de la classe i.

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

$$d_{10} = \sum n_i d_i / \sum n_i$$

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

$$d_{32} = \sum n_i d_i^3 / \sum n_i d_i^2$$

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

$$d_{43} = \sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3$$

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

$$\text{Dispersion} = d_{43}/d_{10}$$

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

La taille des microsphères est déterminée par microscope optique (OPTIKA 4083. B1). Un échantillon de 500 microsphères est analysé. Cette population est divisée en classes de diamètres d_i qui correspond au centre de classe.

On dénombre alors l'effectif dans chaque classe ce qui nous permet le calcul statistique, on calcul ensuite les fréquences : en nombre, en surface et en masse, ainsi la dispersion.

Les résultats des distributions sont donnés dans le tableau III-4 ; III-5 et le tableau III-6

Classe (μm)	Centre de classe	Effectif ni	$ni \cdot di$	Fréquence en nombre %	$ni \cdot di^2$	Fréquence en surface %	$ni \cdot di^3$	Fréquence en masse%	$ni \cdot di^4$
0-50	25	540	13500	8,54836156	337500	2,29679724	8437500	0,503557541	210937500
50-100	75	1251	93825	59,4111129	7036875	47,8882225	527765625	31,49752418	39582421875
100-150	125	305	38125	24,1412063	4765625	32,4316277	595703125	35,55209489	74462890625
150-200	175	42	7350	4,65410796	1286250	8,7533495	225093750	13,43379617	39391406250
200-250	225	14	3150	1,9946177	708750	4,82327421	159468750	9,517237521	35880468750
250-300	275	6	1650	1,04479975	453750	3,08791629	124781250	7,44705652	34314843750
300-350	325	1	325	0,20579389	105625	0,71881247	34328125	2,04873318	11156640625
Somme	1225	2159	157925	100	14694375	100	1675578125	100	4,8618E+15

Tableau III.4 : Résultats granulométriques de M1

Classe (µm)	Centre de classe	Effectif ni	ni*di	Fréquence en nombre %	ni*di ²	Fréquence en surface %	ni*di ³	Fréquence en masse%	ni*di ⁴
0-50	25	356	8900	6,9496718	222500	4,03353728	5562500	0,90012642	139062500
50-100	75	396	29700	43,3260394	2227500	40,3806934	167062500	27,034134	12529687500
100-150	125	133	16625	14,5514223	2078125	37,672785	259765625	42,0353982	32470703125
150-200	175	24	4200	2,62582057	735000	13,3242692	128625000	20,8141593	22509375000
200-250	225	5	1125	0,54704595	253125	4,58871516	56953125	9,21618205	12814453125
Somme	625	914	60550	100	5516250	100	617968750	100	80463281250

Tableau III.5 : Résultats granulométriques de M2

Classe (µm)	Centre de classe	Effectif ni	ni*di	Fréquence en nombre %	ni*di ²	Fréquence en surface %	ni*di ³	Fréquence en masse%	ni*di ⁴
0-50	25	251	6275	8,27290705	156,875	2,1	3921875	0,43	98046875
50-100	75	543	40725	53,6914964	3054375	40,94	229078125	25,35	171664359
100-150	125	159	19875	26,2030323	2484,375	33,3	310546875	34,37	38818359
150-200	175	36	6300	8,30586684	1102,5	14,78	192937500	21,35	33764062
200-250	225	8	1800	2,37310481	405	5,43	91125000	10,1	20503125
250-300	275	2	550	0,72511536	151,25	2,03	41593750	4,6	11438281
300-350	325	1	325	0,42847726	105,625	1,42	34328125	3,8	11156640
Somme	1225	1000	75850	100	7460	100	90353125	99,99	385535935

Tableau III.6 : Résultats granulométriques de M3

De ces résultats on peut déterminer les diamètres moyens pour calculer la polydispersité de système de microsphère, ils sont définis dans le tableau ci-dessous :

	d₁₀	d₃₂	d₄₃	Dispersion
M1	73.14	114.02	140.24	1.91
M2	66.24	112.02	130,2	1,96
M3	75.85	121.11	147.15	1.94

Tableau III.7 : Les diamètres moyens et la dispersion des microsphères

La distribution en taille des microsphères est donnée dans les graphes suivants pour Les 3 microsphères:

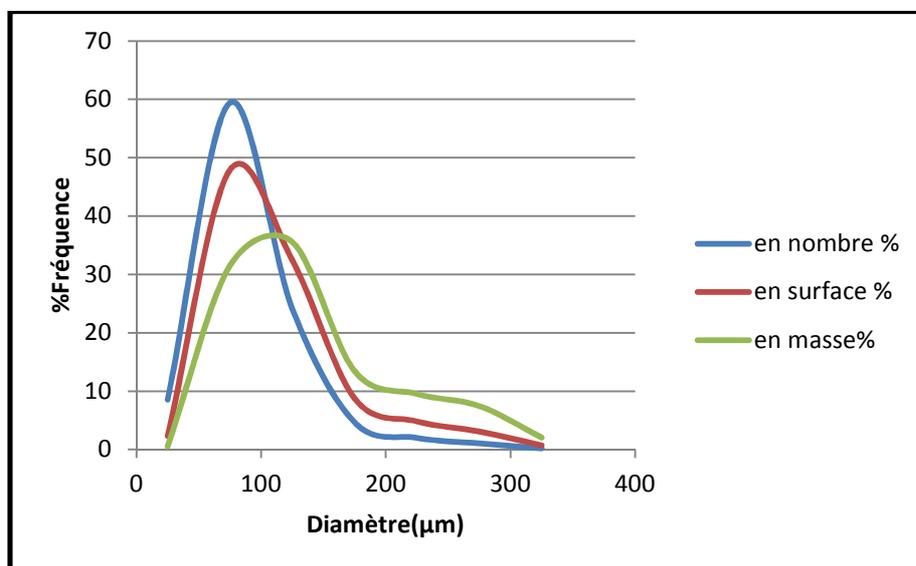


Figure III.5 : La distribution en taille de M1

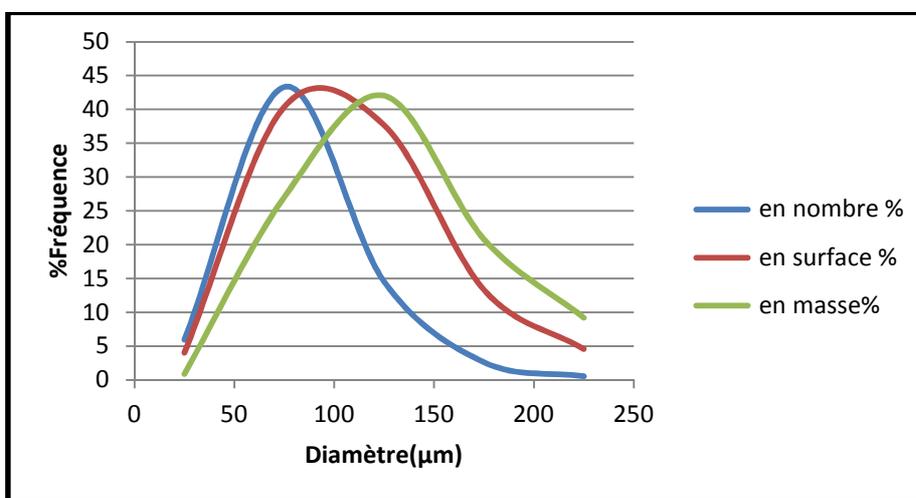


Figure III.6 : La distribution en taille de M2

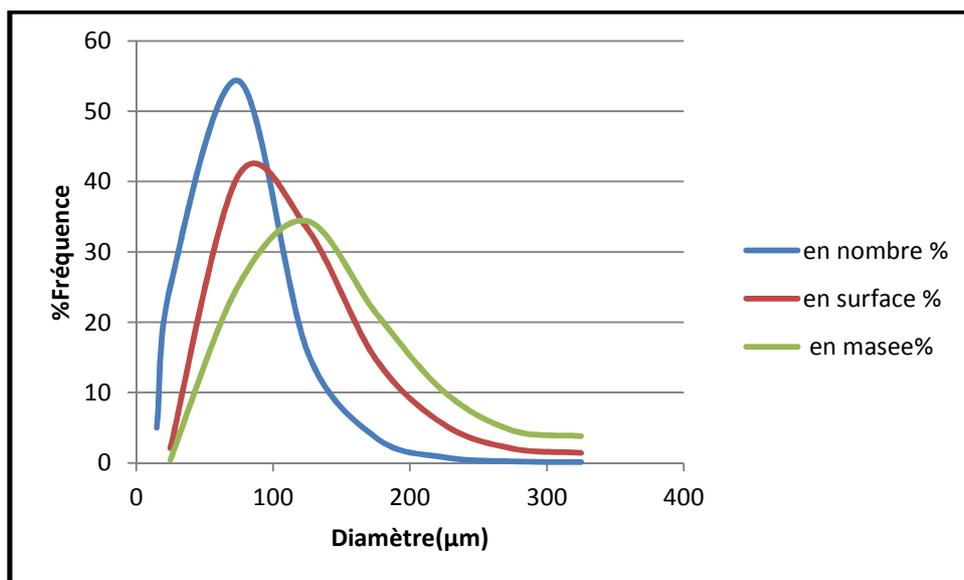
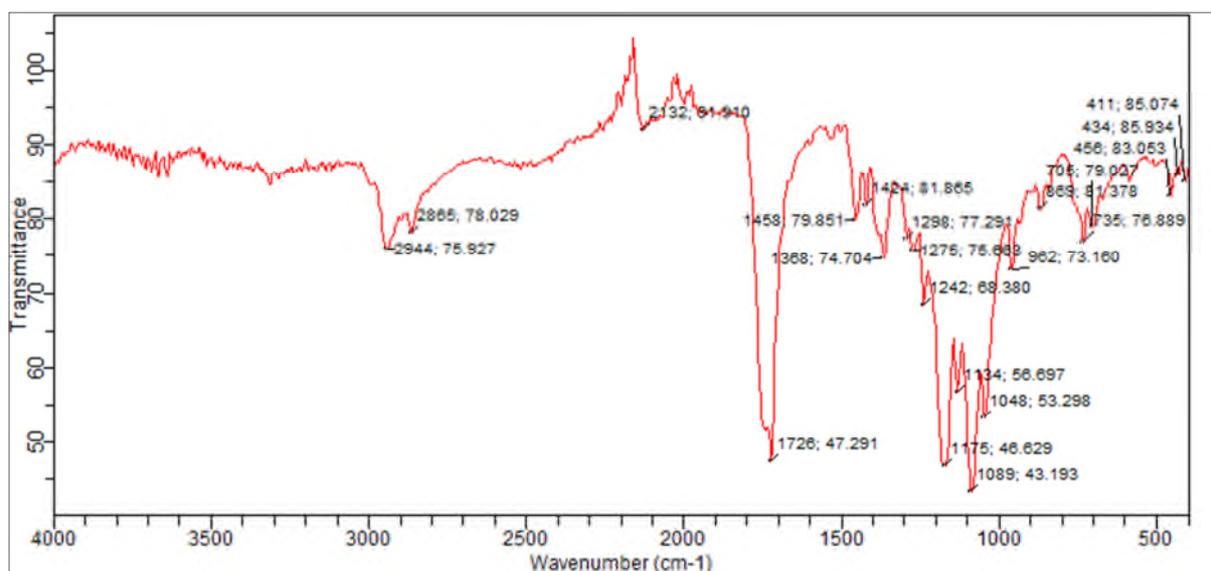


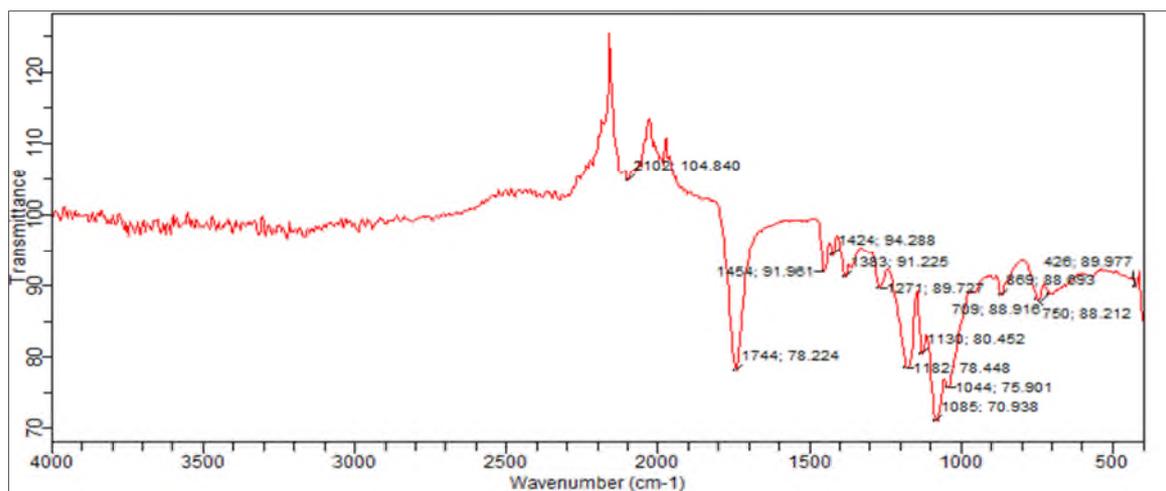
Figure III.7 : La distribution en taille de M3

III. 2.2. Spectroscopie Infrarouge:



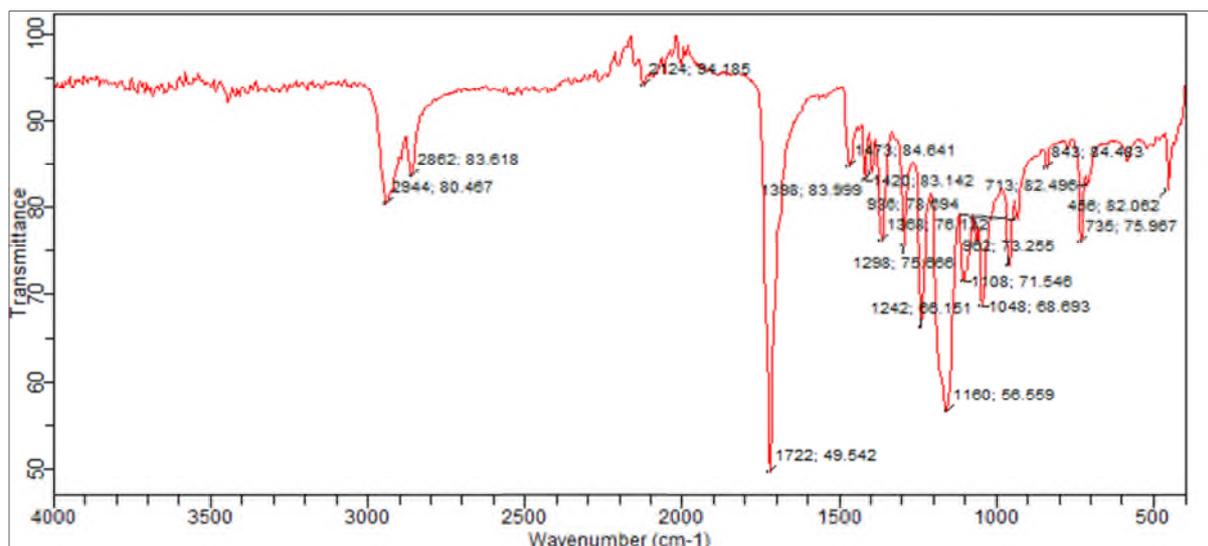
Longueur d'onde	Fonction organique
1089.43193-1368.74704	C-O
1726.47291	C=O
2865.78029	C-H (CH ₂)

Figure III.8 : Spectre Infrarouge de M1



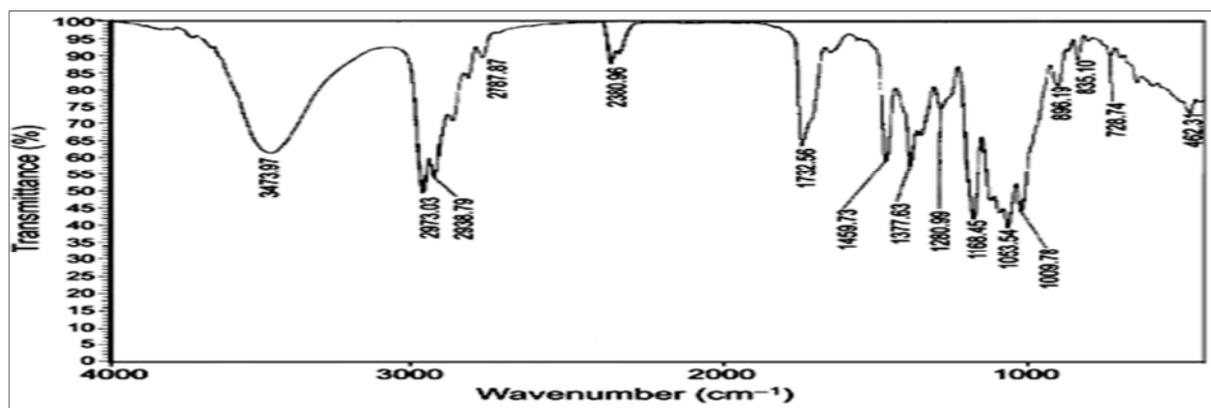
Longueur d'onde	Fonction organique
1085.70938-1182.78448	C-O
1744.78224	C=O

Figure III.9 : Spectre Infrarouge de M2



Longueur d'onde	Fonction organique
1160.56559	C-O ethers
1368.76132	C-N
1473.84641	C-O(ester)
1722.49542	C=O
2944.80467	C-H (CH ₃)
2862.83618	C-H (CH ₂)

Figure III.10 : Spectre Infrarouge de M3



Longueur d'onde	Fonction organique
1168.45	C-O ethers
1377.63	C-N
1732.56	C=O
2973.03	C-H (CH ₃)

Figure III.11 : Spectre Infrarouge d'ER

L'analyse infrarouge montre la présence d'une bande d'absorption de vibration à 1160 cm^{-1} caractérisant le groupement C-O 1168.45 cm^{-1} et le groupement C-N aromatique qui apparaît dans M3 et n'est pas présente dans M1 et M2 ce qui montre la présence de l'érythromycine dans la formulation et une bonne dispersion du PA dans les microparticules M3.

III. 2.3. Par DRX :

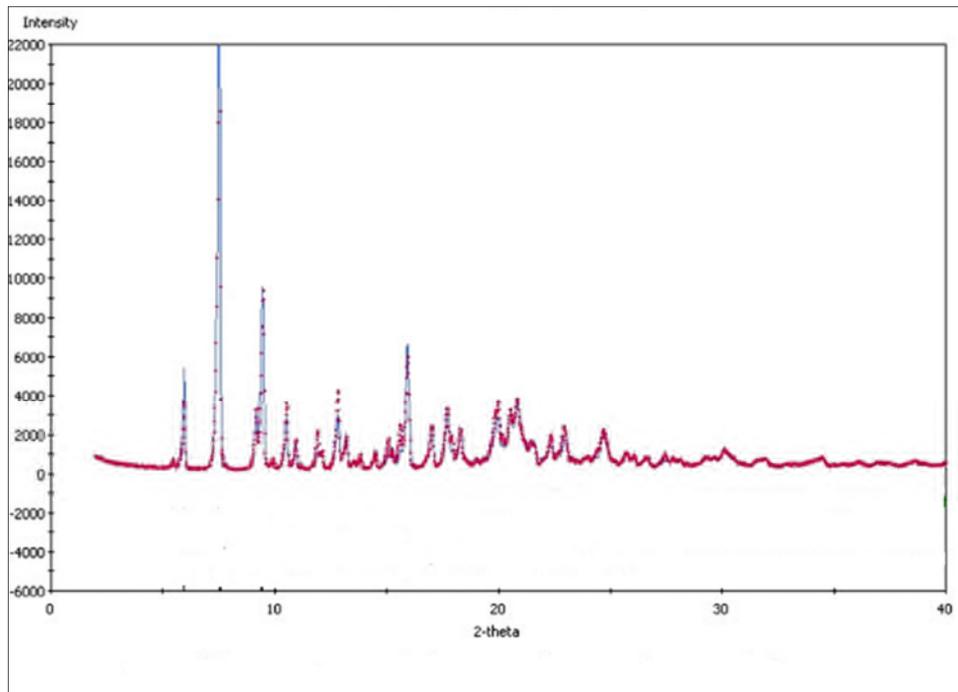


Figure III.12 : Le diffractogramme de ER théorique

D'après le diffractogramme DRX de ER on observe un pic important, très fin à $2\theta=7^\circ$; est un produit cristallin avec des micro-domaine amorphe.

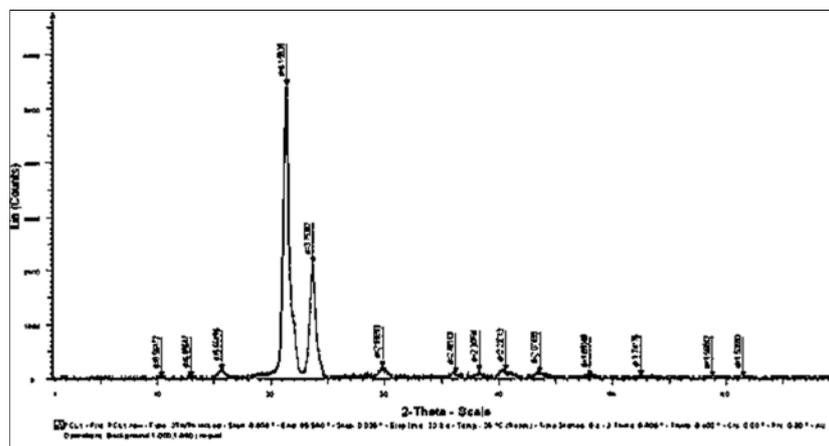


Figure III.13 : Le diffractogramme de M1

Pour les M1(microsphères à base de PCL),on note aussi que le polyester est un polymère très cristallin avec un pic très fin à $2\theta=21^\circ$.

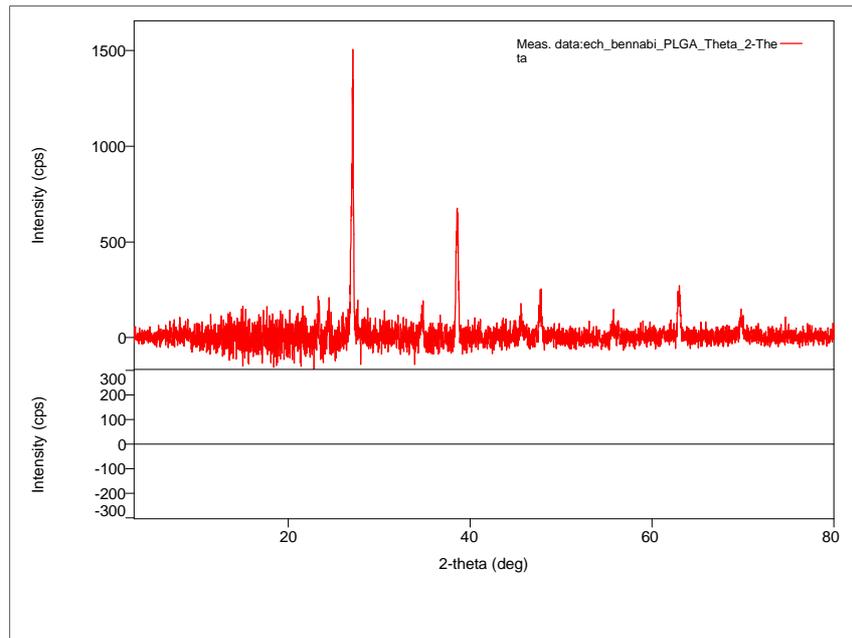


Figure III.14 : Le diffractogramme de M2

Le diffractogramme représente un produit aussi cristallin que le PCL on observe un pic très fin et assez important à $2\theta=29^\circ$

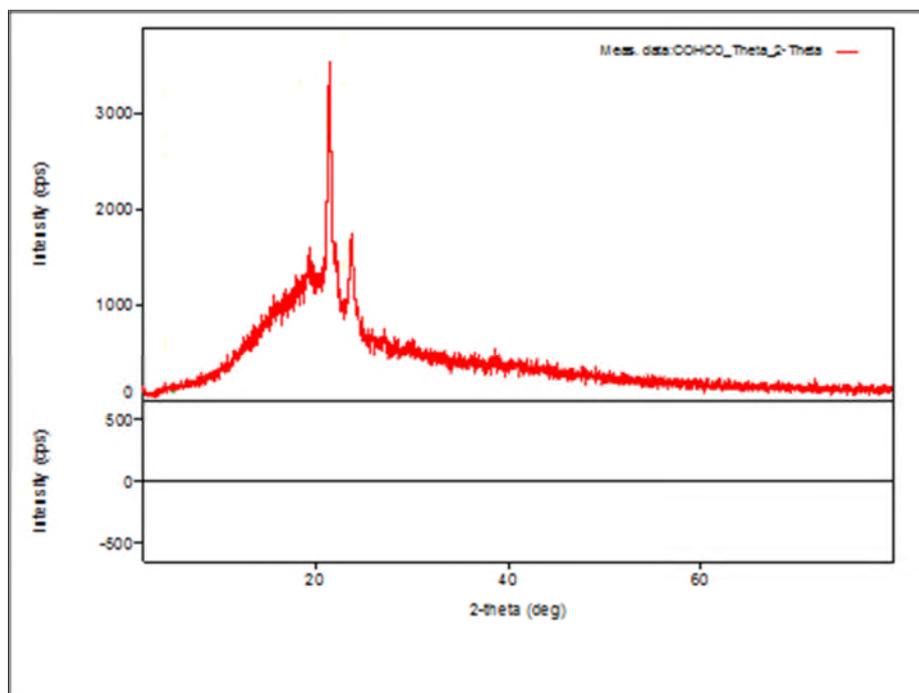


Figure III.15 : Le diffractogramme de M3

Afin de savoir où se trouve la dispersion du produit cristallin ER, nous avons suivi les pics cristallins cités dans les diffractogrammes M1 et M2 et celui de ER dans le diffractogramme M3.

Pour les microsphères, le diffractogramme qui est présenté dans la figure III.15 ,on remarque l'absence pics qui correspondent à l' érythromycine($2\theta=7^\circ$) ,par contre la présence des pics de M2 et M1

D'après ces remarques, on peut conclure qu'ER est dispersé dans la partie amorphe des microsphères, ce qui confirme les résultats obtenus par la libération du PA, puisque on a noté un taux de relargage de 80%.

III. 3. Etude de la cinétique de la libération de principe actif dans le pH=1.2 et le pH=7.4 :

III. 3.1. Facteurs influençant les transferts de matières :

➤ L'agitation du milieu

La concentration de la solution devrait être uniforme en tout point de la solution, et cette uniformité est maintenue grâce à l'action d'un agitateur magnétique dans le flacon (vitesse de rotation fixée à 750 rpm pour toutes les expériences). Puisque le non agitation du milieu réactionnel entraînera la formation d'un gradient de concentration à l'intérieur de la solution, donc source d'erreur lors des analyses en spectrophotométrie U.V.

➤ La température du milieu

L'influence de la température est très importante dans les phénomènes de diffusion (intervient dans la solubilité du principe actif et facilite la diffusion). Toutes nos expériences ont été effectuées à température constante 37°C (température du corps humain), à l'aide d'un agitateur chauffant.

➤ La nature du milieu, son pH et son volume

- La nature du milieu, comme la température, intervient sur la solubilité de l'agent actif, laquelle influera sur la diffusion.
- Le pH du milieu influe sur la vitesse d'hydrolyse et sur la solubilité du principe actif.
- Le volume du milieu influe d'une part sur la solubilité de l'agent actif, et d'autre part sur sa masse libérée au temps infini (temps à l'équilibre).

Cette influence du volume du liquide conduit à deux méthodes expérimentales :

- **Méthode " non sink" :** où le volume choisi (100 ml) est utilisé pour toute l'expérience. La concentration du principe actif augmente au cours de l'expérience.
- **Méthode "sink" :** le volume est constamment renouvelé par du liquide vierge, le volume utilisé est donc plus grand

La première méthode (non sink) est beaucoup plus facile à réaliser, et c'est cette méthode que nous avons utilisée dans toutes nos expériences.

III. 3.2. Conditions de mesures :

Afin d'assurer une meilleure reproductibilité des résultats des phénomènes observés et se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques, nous avons maintenu constants tous les paramètres suscités pour éviter toute influence sur les transferts de matières :

- **La préparation des microsphères :** est faite de la même manière expliquée.
- **Le support des microsphères :** il est en fibres de verre, un peu élevé par rapport au barreau aimanté afin d'éviter les chocs qui peuvent s'y produire et permet aussi une bonne agitation et circulation du liquide autour de la forme galénique.
- **La composition du milieu d'étude :** la préparation du milieu liquide environnant se fait par quantité de 5 litres afin d'assurer toutes les dilutions nécessaires pour une même expérience avec le même liquide.
- **La température :** maintenue constante à 37°C à l'aide d'un agitateur chauffant.
- **L'agitation :** constante durant toutes nos expériences, et fixée sur 500 rpm à l'aide d'un agitateur magnétique.
- **La longueur d'onde maximale :** les mesures sont effectuées à l'aide d'un appareil UV. Vis calibré à une longueur d'onde fixe propre au principe actif étudié

La quantité de l'agent actif encapsulé dans les microsphères

III. 3.2.a) Composition du milieu d'étude :

Pour nos différentes études cinétiques, on a choisi de reconstituer deux milieux physiologiques pH = 1.2 et pH = 7.4 ; ces milieux correspondent aux temps de séjours les plus importants lors du tractus digestifs, ils sont préparés conformément aux normes décrites par la pharmacopée américaine U.S Patent XX :

➤ **La préparation de pH=1.2 :**

HCl: 1N 80ml, NaCl: 2g, Eau distillée: 1l.

➤ **La préparation de pH = 7.4 :**

NaOH: 0.1M 394ml, KaH_2PO_4 : 0.2M 250ml.

Les milieux physiologiques artificiellement reconstitués de pH = 1.2 et pH = 7.4 à 37°C, vont nous permettre d'évaluer l'effet de la matrice et de sa composition ainsi que l'influence du milieu sur la cinétique de libération du principe actif à partir de différents microparticules réalisées.

III. 3.2.b) La détermination de la longueur d'onde maximal pour les deux pH par

UV-Vis:

Les spectres d'absorption de principe actif ont été réalisés sur un appareil JENWAY 7305 Spectrophotomètre liquide dans les deux milieux de pH (1.2 et 7.4) au laboratoire de chimie à l'université Ibn-Khaldoun de Tiaret afin de déterminer λ_{max} . Les nombres d'ondes sont exprimés en nm sont respectivement 286 nm et 268 nm.

III. 3.2.c) Etalonnage de principe actif:

Pour le principe actif érythromycine, nous avons utilisé la méthode qui consiste à préparer d'abord une solution mère de concentration donnée à partir de laquelle nous préparons, par dilutions successives, une série de solutions de concentrations bien déterminées. Celles-ci sont, par la suite, analysées par spectrophotométrie UV-visible.

Nous établissons ainsi la droite d'étalonnage représentant la densité optique, au maximum de la bande d'absorption, en fonction de la concentration C et qui obéit à la relation de Beer Lambert.

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l$$

Où:

ϵ : Coefficient d'absorption spécifique ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

C : la concentration en mol/L de la solution.

l : la longueur de la cellule en quartz (1cm).

La droite $A = f(C)$ étant linéaire, sa pente à l'origine correspond à ϵ .

	pH de milieu	λ_{\max} (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
Erythromycine	1.2	286	115.3
	7.4	268	175.1

Tableau III.8 : Les valeurs des λ_{\max} et ϵ de l'érythromycine dans les différents milieux.

➤ Courbe d'étalonnage de l'érythromycine à pH=1.2

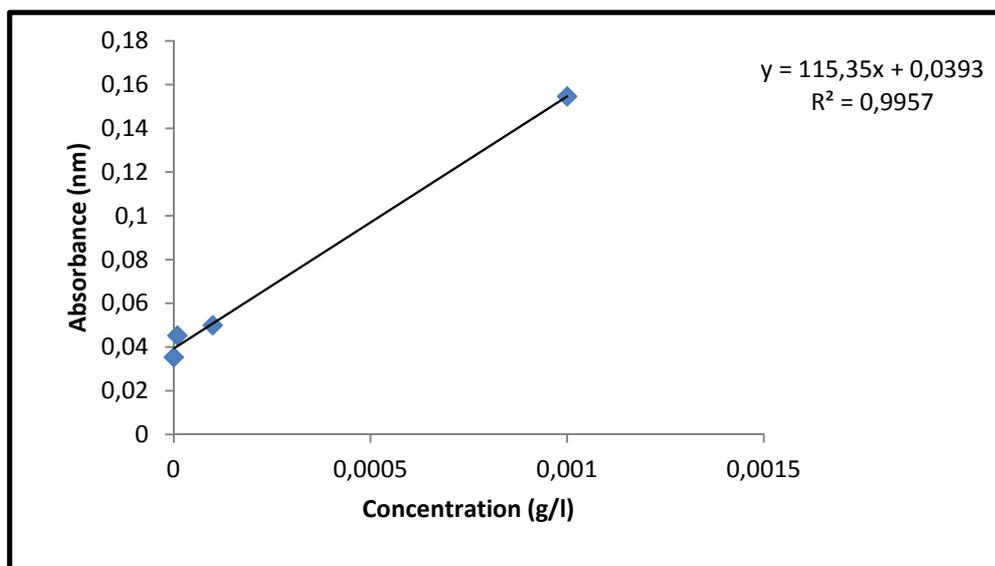


Figure III.16 : Courbe d'étalonnage de l'érythromycine à pH=1.2 (286)

➤ Courbe d'étalonnage de l'érythromycine à pH=7.4

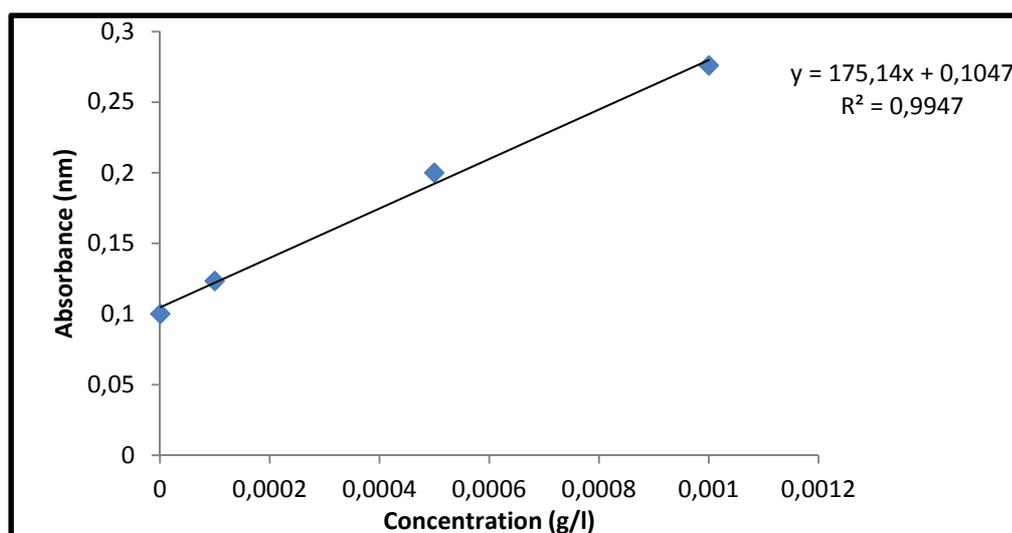


Figure III.17 : Courbe d'étalonnage de ER à pH=7.4 (268nm)

III. 3.3. Mode opératoire :

L'étude des cinétiques de la libération de PA est réalisée avec une masse de 0,1g de microsphères dans 50ml pour chaque milieu de pH

Le taux de la libération de PA est déterminé par suivi cinétique des prélèvements à des intervalles de temps déterminés, qui ont été dilués avec la solution du pH , sous agitation constante durant toute la manipulation et une température constante de 37°C

À l'aide d'une seringue ,1 ml du milieu de dissolution est prélevé du ballon ensuite dilué dans des fioles de 10ml . Le prélèvement est selon la méthode « non sink » : le volume utilisé est conservé tout au long de l'expérience la concentration du principe actif croit au cours du temps. On mesure l'absorbance par UV-Vis.



Figure III.18: Le dispositif expérimental de la libération du PA.

Le taux de PA libéré est donc calculé par rapport à la masse réelle en agent actif contenu dans les microsphères selon la relation suivante :

$$PA = \left(\frac{mt}{mi} \right) \cdot 100\%$$

Avec : $mt = Abs \cdot Vd \cdot \frac{M}{\epsilon} \cdot Vf$

Ou :

m_t : La masse de principe actif à l' instant « t »

V_d : le volume de la fiole de dilution en ml

V_f : le volume du liquide de libération contenu dans le flacon en ml

M : la masse molaire du principe du principe actif (g/mol)

m_i : Masse initiale du principe actif.

Les résultats obtenus sont exposés dans les courbes cinétiques, représentant la quantité de PA libérée en fonction du temps exprimé en (min), sont tracées sur la figure III.19

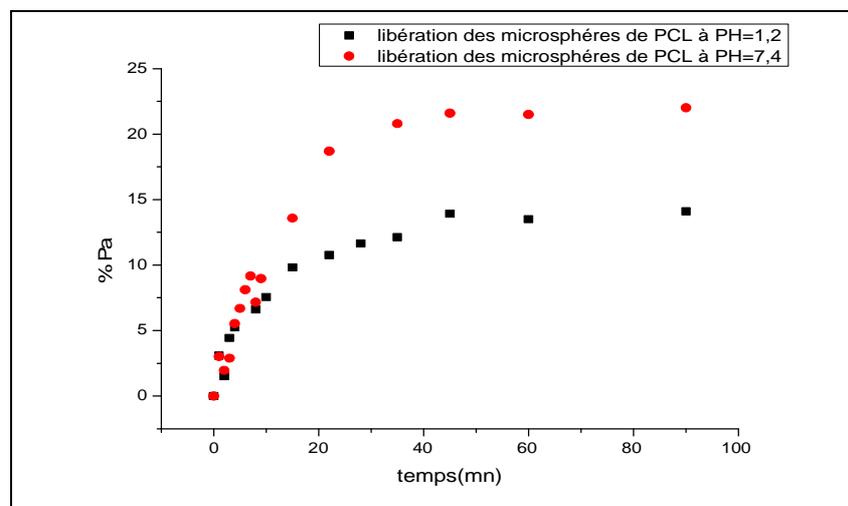


Figure III.19 : Le taux de libération de M1 en fonction du temps

Le graphe de la figure III.19 montre le même profil de libération dans les pH étudiés. Les microsphères ont été préparées, sans PA afin d'évaluer la libération à partir des microparticules formé à 100% de PCL pour expliquer l'effet retard de la libération de ER dans la formulation M3 dans la même longueur d'absorption de ER.

Le pH=1.2 influe sur la cinétique de libération de microsphère PCL à cause de la dégradation (hydrolyse) du polyester dans le pH acide.

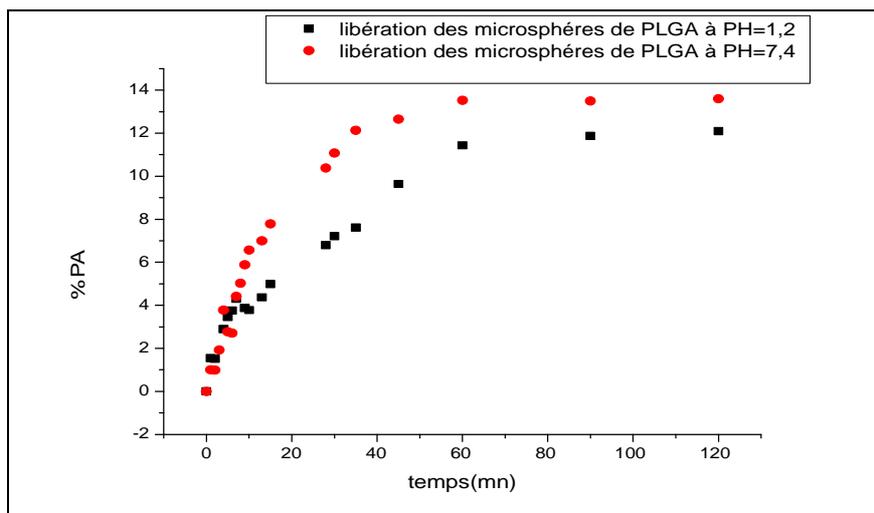


Figure III.20 : Le taux de libération de M2 en fonction du temps

La figure III.20 montre le même profil cinétique que les M1 et la même sensibilité au pH acide

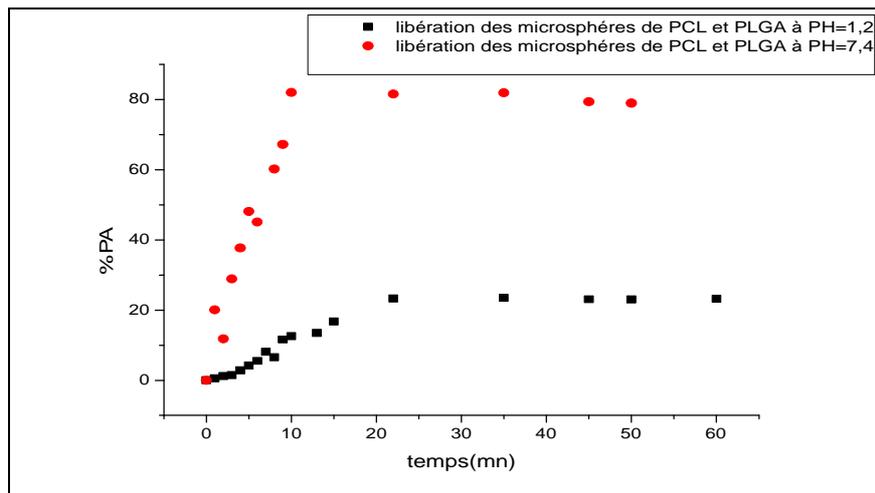


Figure III.21 : Le taux de libération du PA de M3 en fonction du temps

D'après la figure III.21 la libération de ER est favorisé dans le pH=7.4 on note un taux de libération approchant les 80%, le même profil est observé dans le pH=1.2
Le taux de relargage du PA augmente en fonction du temps puis il atteint un palier à 80%

D'après ces résultats ER est libérée plus rapidement dans le pH=7.4 .

Partie B: L'activité antibiotique**III. 1. Introduction :**

Les antibiotiques sont des substances chimiques, qui empêchent la multiplication des bactéries ; Ils ont une toxicité sélectivement dirigée contre les bactéries (cellules procaryotes), mais cette toxicité existe aussi, bien que moindre, pour les cellules de l'organisme humain (cellules eucaryotes); ils exercent leur action en des points précis (cibles) de certaines des chaînes métaboliques des bactéries ; ils provoquent leurs effets à faibles concentration (mg/l) et relativement lentement (heures).

Les antibiotiques peuvent être d'origine naturelle, ou hémi-synthétique ou purement synthétique.[2]

III. 2. Antibiogramme :

- *Principe :*

L'antibiogramme a pour but de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'une souche bactérienne vis-à-vis de divers antibiotiques. La détermination de cette valeur est peu précise, mais elle est consacrée par l'usage et elle bénéficie d'une masse importante d'informations recueillies à son sujet.

III. 2.1. Méthodes de dilution :

Les méthodes de dilution sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide. Elles consistent à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques selon une progression géométrique de raison 2.

A) En milieu liquide :

L'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macrodilution) ou de cupules (méthode de microdilution) contenant l'antibiotique Il reste un tube (contrôle) ou témoin de croissance de la souche à tester. La galerie ainsi préparée sera incubée à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible.

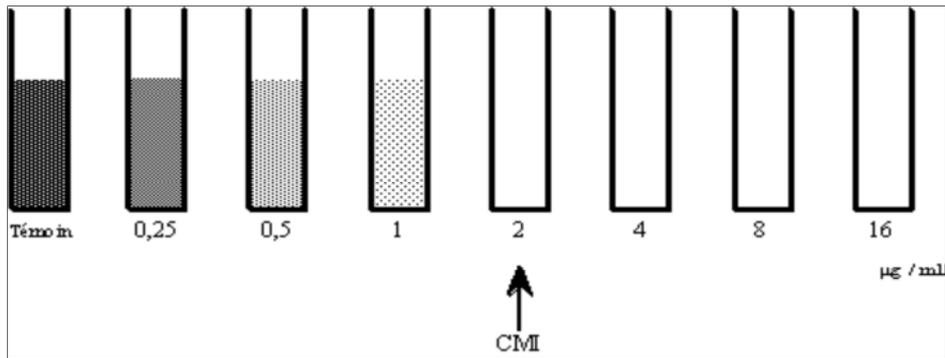


Figure III.22 : Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide.

La CMI de la souche testée est de 2 µg/mL (premier tube dans lequel aucune croissance n'est visible à l'œil nu).

B) En milieu solide :

Consiste à incorporer l'antibiotique à une concentration donnée dans la gélose, maintenue liquide à 42°C. Une série de boîtes de Pétri est préparée avec des concentrations d'antibiotique variant selon une progression géométrique de base de 2, comme précédemment. Puis sont préparées les suspensions des différentes bactéries à examiner qui sont alors distribuées dans les microcupules métalliques (exemple d'un système à 20 cupules).

Des tiges métalliques stériles plongent dans chaque cupule. Puis par un mouvement de translation sont déposées les différentes bactéries sous le même volume (de l'ordre du microlitre) à la surface du milieu gélosé ou solide.

Après avoirensemencé la série de boîtes, celles-ci sont incubées dans une étuve jusqu'au lendemain. La lecture est alors effectuée: il est facile de repérer l'emplacement de chaque souche et de noter croissance ou absence de croissance.

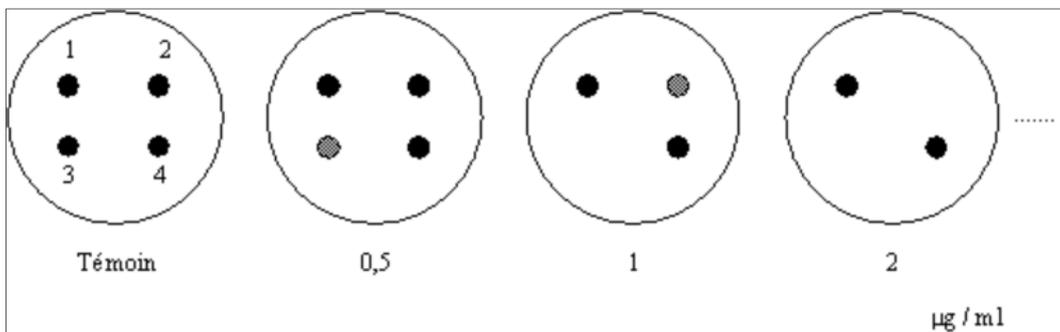


Figure III.23 : Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé.

Une boîte de Pétri permet de tester jusqu'à 30 souches différentes. Dans l'exemple présenté ci-dessus, le nombre de souches est limité à quatre.

La CMI de la souche 3 vis-à-vis de l'antibiotique incorporé à la gélose est de 1 µg/mL.

La CMI de la souche 2 est de 2 µg/mL. Les déterminations des CMI des souches 1 et 4 nécessiteraient de tester des concentrations plus fortes en antibiotique.[3]

❖ **Les avantages de la dilution en gélose comprennent :**

- La capacité de tester plusieurs bactéries sur le même ensemble de boîtes de gélose en même temps (à l'exception des bactéries envahissantes) ;
- Le potentiel d'améliorer l'identification des points finaux de la CMI et de développer la gamme de concentration antibiotique ;
- La possibilité de semi-automatiser la méthode en utilisant un appareil de réplique des inoculum. Des appareils de réplique des inoculum sont disponibles commercialement et ils peuvent transférer entre 32 et 36 inoculum bactériens différents sur chaque boîte de gélose.[4]

III. 2.2. Méthode de la diffusion en disque :

La diffusion en disque se réfère à la diffusion d'un agent antimicrobien d'une concentration spécifique à partir de disques, tablettes ou bandes, dans le milieu de culture solide, qui a étéensemencé avec l'inoculum choisi et isolé en culture pure . La diffusion en disque est basée sur la détermination d'une zone d'inhibition proportionnelle à la sensibilité bactérienne à l'antimicrobien présent dans le disque.

La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de cultureensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Le diamètre de cette zone d'inhibition autour du disque d'antimicrobien est corrélée avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière bactérie / antimicrobien, la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai. Généralement, plus la zone d'inhibition est importante, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne des organismes est faible. Cependant, cela dépend de la concentration d'antibiotique contenue dans le disque et de sa diffusibilité.

Note : Les essais de diffusion en disque qui sont basés uniquement sur la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition en négligeant la taille de la zone d'inhibition ne sont pas acceptables pour les méthodologies AST.[5]

III. 2.2.a) Procédure de diffusion en gélose :[6][7]

La méthode de diffusion en milieu gélosé présentée dans ce chapitre a été standardisée par le Comité national des normes pour laboratoires cliniques (NCCLS) et elle est exécutée exactement comme l'indique le protocole ci-après.

1. Gélose de Mueller-Hinton :

La gélose de Mueller-Hinton est le seul milieu de culture solide pour l'étude de sensibilité qui ait été validé par le NCCLS. Il est recommandé de toujours utiliser la gélose Mueller-Hinton pour les épreuves de diffusion en gélose, en fonction des directives internationales et du NCCLS. Étant donné que la manière dont la gélose Mueller-Hinton est préparée peut affecter les résultats de la procédure de diffusion par disque, il est très important de se reporter à la section C ci-après pour des instructions sur la préparation et le contrôle de qualité de ce milieu.[7]

2. Préparation du standard de turbidité McFarland :

Un standard de McFarland 0,5 doit être préparé et un contrôle de la qualité sera effectué avant de commencer le test de sensibilité. S'il est hermétiquement fermé et gardé dans le noir, le standard peut être conservé pendant 6 mois. Le standard McFarland est utilisé pour ajuster la turbidité de l'inoculum pour le test de sensibilité.

3. Préparation de l'inoculum :

Chaque culture doit être ensemencée en stries sur une gélose non inhibitrice (gélose au sang, gélose d'infusion de cœur et de cerveau ou gélose trypticase soja) pour obtenir des colonies isolées. Après une incubation d'une nuit à une température comprise entre 35 et 37°C, choisir 4 à 5 colonies bien isolées avec une anse ou une aiguille d'inoculation et les transférer dans un tube de solution salée stérile ou dans un bouillon non sélectif (bouillon de Mueller-Hinton, bouillon d'infusion de cœur ou trypticase soja).

Émulsionner une quantité suffisante de culture bactérienne dans la solution salée ou le bouillon pour que la turbidité avoisine celle du standard McFarland 0,5. Cette comparaison

peut être faite plus facilement si les tubes sont observés contre une fiche de papier blanc avec lignes noires (voir Figures III.24). Si c'est nécessaire, la turbidité peut être diminuée en ajoutant plus de solution saline stérile ou de bouillon.

La méthode de culture peut aussi être utilisée pour préparer l'inoculum. Quatre ou cinq colonies issues de la culture développée pendant une nuit sur la gélose sont inoculées dans le bouillon (bouillon de Mueller-Hinton, infusion de coeur ou bouillon trypticase soja). Incuber le bouillon à 35°C jusqu'à ce qu'il devienne trouble et ensuite ajuster la turbidité à la bonne densité.

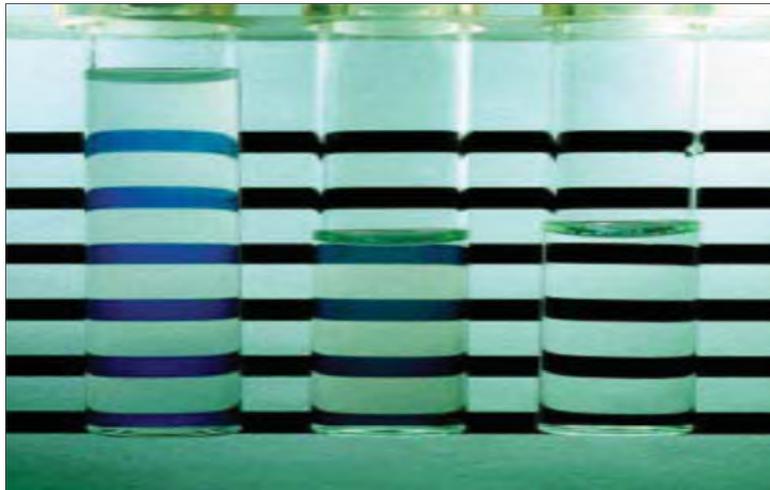


Figure III.24 : Comparaison de McFarland 0,5 avec la suspension de l'inoculum. De gauche à droite, les tubes sont le standard McFarland 0,5, E. Coli ATCC 25922 ajusté à la turbidité McFarland 0,5 et la solution saline non inoculée

4. Procédure d'inoculation :

Dans les 15 minutes suivant l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, tremper un écouvillon de coton dans la suspension. Presser fermement contre la paroi intérieure du tube juste au-dessus du niveau du liquide, tourner l'écouvillon pour enlever les liquides excédentaires. Étaler à trois reprises sur la surface entière de la gélose, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum (Figure III.25). Enfin, écouvillonner partout autour du bord de la surface de la gélose.

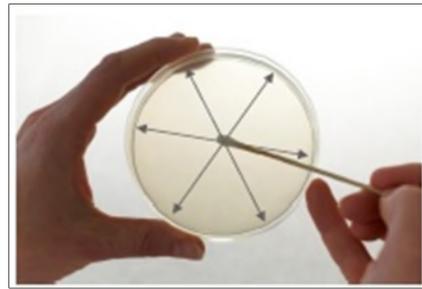


Figure III.25: Inoculation des boîtes de Petri

5. Disques imprégnés d'antibiotiques :

Les réserves de disques imprégnés d'antibiotiques doivent être gardées au réfrigérateur (4°C). Une fois les disques retirés du réfrigérateur, laisser à température ambiante les récipients fermés pendant environ une heure pour permettre à la température de s'équilibrer. Cela limite la condensation qui se produit quand l'air entre en contact avec les disques. Si on utilise un distributeur, son couvercle doit fermer et parfaitement il doit être conservé au réfrigérateur. Il faut également le laisser se réchauffer à température ambiante avant l'utilisation.

Appliquer les disques d'antibiotiques sur les boîtes de Pétri dès que possible mais pas plus de 15 minutes après l'inoculation. Placer les disques individuellement avec des pinces stériles ou avec un distributeur mécanique et les placer doucement contre la gélose. En général, il ne faut pas placer plus de 12 disques sur une boîte de 150 mm et pas plus de 4 disques sur une boîte de 100 mm. Cela évite le chevauchement des zones d'inhibition et une erreur possible de mesurer. Certains antimicrobiens du disque diffusent presque immédiatement et par conséquent, une fois que le disque entre en contact avec la surface de la gélose, il ne doit plus être déplacé.

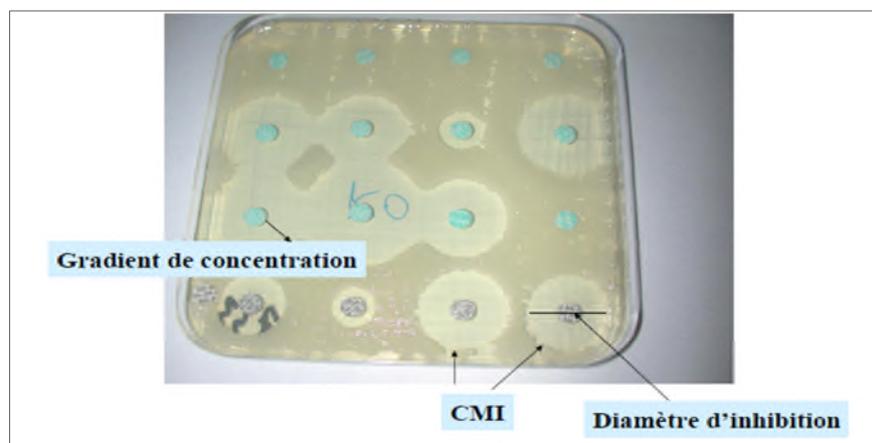


Figure III.26 : Application des disques d'antibiotiques

6. Lecture et interprétation des résultats :

Une fois que les disques sont placés sur la gélose, il faut incuber la boîte à 35°C pendant 16 à 18 heures. Après une nuit d'incubation, le diamètre de chaque zone d'inhibition (diamètre du disque compris) est mesuré en mm et noté. Les mesures peuvent être prises avec une règle sur le fond de la boîte sans enlever le couvercle.

Dans la pratique, les résultats de la technique des disques doivent être considérés comme uniquement qualitatifs en raison de la variabilité expérimentale des diamètres et de l'erreur sur les valeurs de la pente et de l'ordonnée à l'origine des droites de régression.

Ces droites de concordance sont tracées expérimentalement à l'aide de nombreuses souches. En général, on utilise un minimum de 100 souches appartenant au moins à quatre genres bactériens différents.

Une droite de concordance n'est valable que pour un disque contenant une quantité déterminée d'un antibiotique donné.

Les zones d'inhibition doivent être comparées au tableau d'interprétation des tailles des zones et notées en fonction des catégories suivantes : sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R) pour chaque antibiotique testé.



Figure III.27 : Lecture des zones d'inhibition

III. 2.2.b) Intérêts pour l'utilisation de la méthode de diffusion par disque :

La diffusion en disque est facile à mettre en œuvre, reproductible et ne nécessite pas d'équipement onéreux. Ses principaux avantages sont :

- Un faible coût ;
- Une facilité de modification des disques antimicrobiens si nécessaire ;
- Elle peut être utilisée comme test de tri lorsqu'il y a un grand nombre d'isolats ;

- Elle peut identifier un sous-groupe d'isolats destinés à des tests ultérieurs par d'autres méthodes, telle que la détermination de la CMI.

La mesure manuelle des zones de d'inhibition peut prendre du temps. Les dispositifs automatisés avec zone de lecture sont disponibles et peuvent être intégrés avec le rapport de laboratoire et les systèmes de manipulation de données. Les disques devraient être distribués également de sorte que les zones d'inhibition autour des disques antimicrobiens dans l'essai de diffusion en disque ne se chevauchent pas et qu'ainsi la zone d'inhibition puisse être déterminée. Généralement cela peut être effectué si les disques sont distants d'au moins 24 mm de centre à centre, bien que cela dépende de la concentration du disque et de la capacité de l'antimicrobien à diffuser dans la gélose.[4]

III. 3. Mode opératoire :

III. 3.1. Préparation de la suspension :

Une suspension bactérienne de densité équivalente au standard de 0.5 Mac Farland (0.1-0.08) est préparée puis diluée à une DO= 0.095 pour la souche de *Pseudomonas aeruginosa*, la même valeur pour *Escherichia coli* et la souche *Staphylococcus aureus* leur DO= 0.091 ($\lambda=630\text{nm}$)

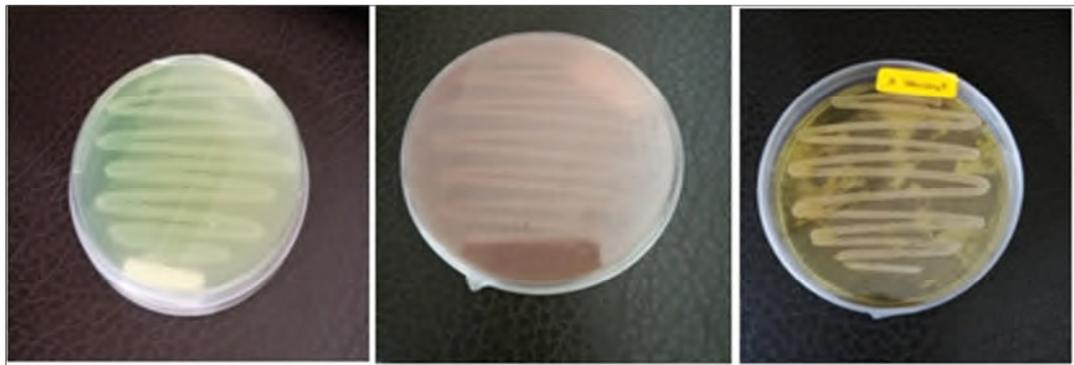


Figure III.29 : Les 3 souches bactériennes *Pseudomonas* ; *E. coli* et *S. aureus*

III. 3.2. La méthode de dilution en milieu liquide :

1ml des prélèvements de la cinétique de libération de l'érythromycine du pH7.4 sont placés dans des tubes stériles contenant 1000 μL de la suspension bactérienne de chaque souche, ensuite ils ont été incubés à 30°C, pendant 48 heures .Le témoin (standard) a été préparé sous les mêmes conditions dans le milieu pH=7.4



Figure III.30 : La méthode de dilution en milieu liquide

III. 3.3. La méthode de diffusion par disque :

La gélose de Mueller-Hinton a été préparée, autoclavée pendant 20mn à 130C°, ensuite écoulee dans des boites de Pétri. Après l'ensemencement, quatre disques stériles de 6 mm de diamètre sont déposés sur la gélose M.H, les disques imbibé avec 15 μ L du prélèvement de la cinétique

Un témoin disque chargé de 15 μ g d'érythromycine est incubé avec les disques chargés avec le prélèvement de la cinétique, pour comparer ensuite les diamètres .Afin de tester l'activité inhibitrice des disques imbibés avec :

- Du milieu d'étude,
- Les polymères PLGA et PCL (pour 0.0029g de PCL et 0.0033 de PLGA en présence de 1ml DCM)
- Le solvant le dichlorométhane utilisé pour nos expériences.

On été incubés à 30°C pendant 48 heures. Après incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètres avec un pied à coulisse.

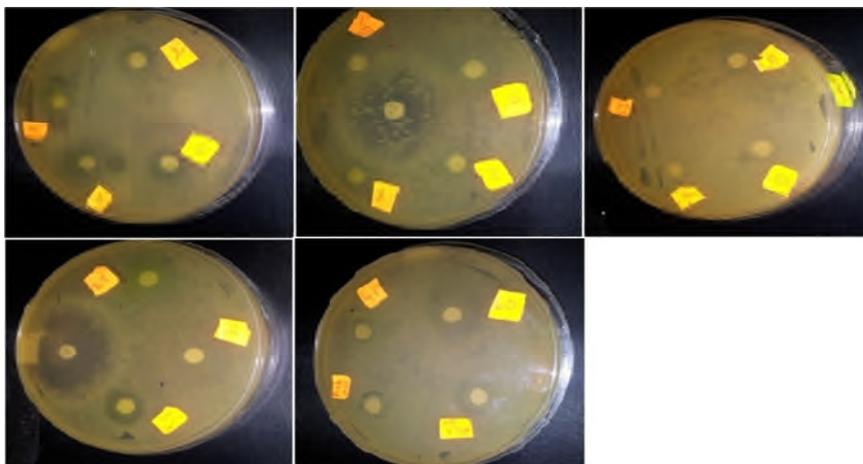


Figure III.31 : Les diamètres d'inhibition des prélèvements obtenus pour S. aureus

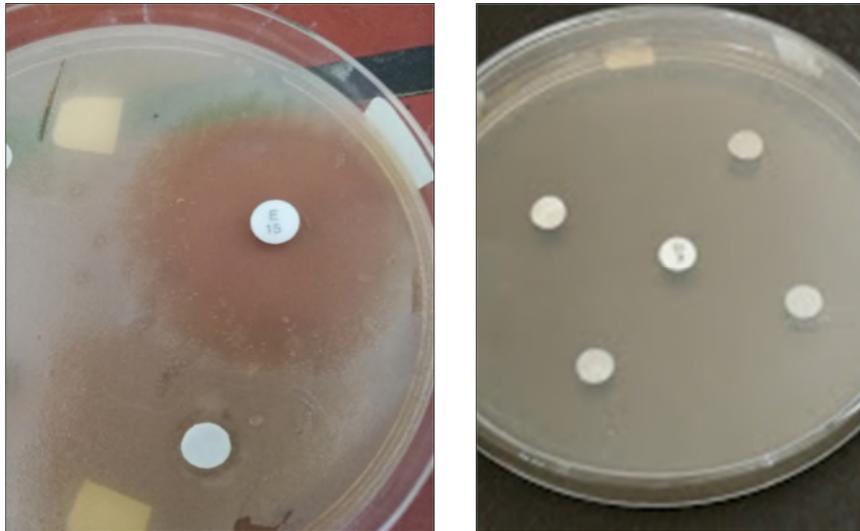


Figure III.32 : Diamètre d'inhibition ER obtenu pour *S. aureus*



Figure III.33 : Aucun diamètre d'inhibition pour PSEUDO

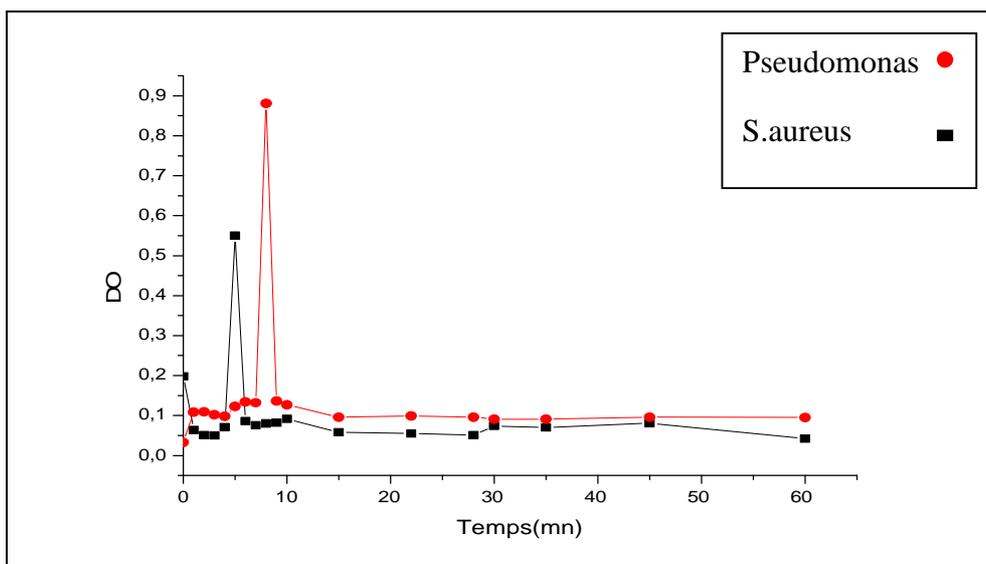


Figure III.34 : Evolution des DO des souches S.aureus et Pseudomonas après 48h

D’après le graphe ci-dessus l’absorbance du milieu de la cinétique ensemencé par Pseudomonas montre une absorbance plus importante que celle des milieux ensemencés par le S.aureus, ce qui est en accord avec la littérature (annexe Tableau II) puisque l’érythromycine ne peut pas inhiber cette souche par contre elle a un pouvoir inhibiteur sur S.aureus.

Temps	D (mm)	%PA
0	0	0
1	9	20%
3	11	28%
15	8,5	31.98
22	9	40%
35	16	82%

Tableau III.9 : Les diamètres obtenus pour S.aureus en fonction du pourcentage de la libération d’ER

Le tableau 2 montre l’évolution des diamètres d’inhibitions en fonction de pourcentage de relargage de l’érythromycine les résultats montrent que les diamètres d’inhibition sont

proportionnels, le pourcentage de libération du PA le plus important est à (35min) correspond au diamètre le plus important (16mm) ce qui signifie une inhibition de la souche grâce à une libération prolongée de l'érythromycine.

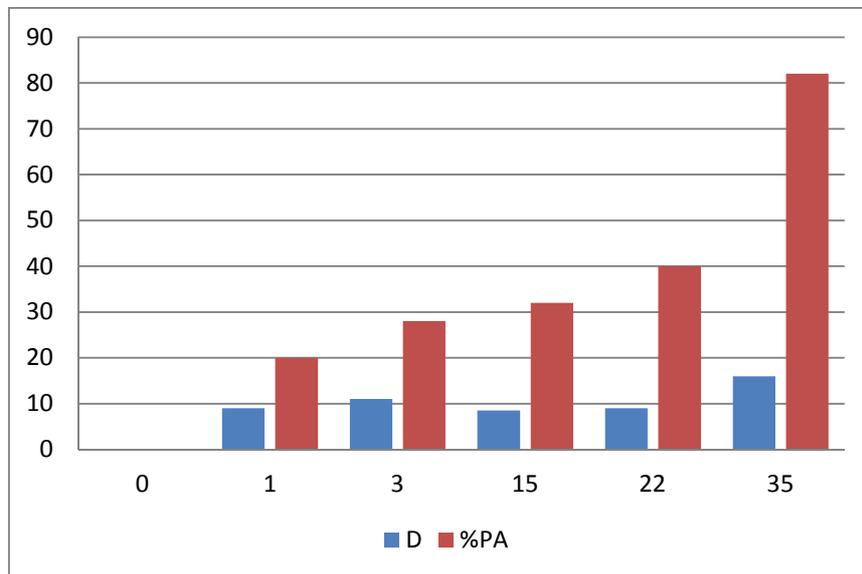


Figure III.35 : Comparaison entre les diamètres d'inhibition et le pourcentage de la libération d'ER en fonction du temps

Conclusion générale

Dans ce travail nous avons préparé des microsphères, à base de polymères biodégradables et biocompatibles afin d'étudier la libération prolongée d'un antibiotique qui est l'érythromycine dans deux milieux physiologiques reconstitués stomacal PH=1.2 et intestinal PH=7.4.

L'étude cinétique du relargage de l'antibiotique a montré une préférence pour le PH=7.4 qui en accord avec la littérature, d'après les profils de libération dans les deux milieux, le taux de libération atteint 80% dans le PH=7.4.

Les microsphères ont été caractérisées par spectroscopie infra rouge et DRX, d'après l'analyse des spectres infrarouge on remarque la présence des bandes caractéristiques de l'érythromycine ce qui prouve que le principe actif est bien dispersé dans la matrice polymère.

Les caractérisations des diffractogrammes DRX d'ER et les polymères blend : PCL et PLGA que le principe actif est dispersé dans la partie amorphe des microsphères, ce qui a facilité sa dissolution et sa diffusion.

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons évalué l'activité antibiotique de l'érythromycine, encapsulé dans les microsphères, nous avons utilisés trois souches référenciées de gram (+) et de gram (-): S.aureus, pseudo, E. coli.

La méthode de diffusion par disques a été adoptée pour évaluer l'inhibition de l'érythromycine par rapport à ses souches, nous avons conclu d'après nos résultats que celle la souche S.aureus a été inhibée par l'érythromycine libéré au cours de la cinétique dans le pH7.4, ce qui rejoint la littérature, un disque chargée uniquement de l'érythromycine a été pris comme témoin et le diamètre d'inhibition est dans la moyenne mentionnée par la littérature.

Les diamètres d'inhibitions obtenus sont proportionnels avec le taux de libération de l'érythromycine, et la diminution de l'absorbance du témoin la plus basse correspond à une inhibition de la souche dans le milieu liquide de la cinétique testé ensemencé par S.aureus en comparant avec les milieux ensemencés par pseudo.

Les résultats obtenus sont satisfaisants ce qui nous pousse à évaluer l'activité de nos microsphères in vivo afin d'évaluer la fiabilité des résultats obtenus in vitro.

Liste des figures

Figure I.1 : Classification des polymères biodégradables.....	5
Figure I.2 : Les familles des polyesters biodégradables.....	6
Figure I.3 : Structure de polycaprolactone PCL.....	7
Figure I.4 : Schéma général d'une polymérisation par ouverture de cycle.....	9
Figure I.5 : Réaction de rétroscission.....	9
Figure I.6 : Réaction de redistribution.....	9
Figure I.7 : Mécanisme de la polymérisation cationique de l' ϵ -caprolactone proposé par Penczek et al.....	10
Figure I.8 : Mécanisme de polymérisation anionique par ouverture de cycle de l' ϵ -caprolactone.....	11
Figure I.9 : Structure de l'acide poly(lactique-co-glycolique) avec x et y le ratio de monomères d'acide lactique et d'acide glycolique, respectivement.....	12
Figure I.10 : Hydrolyse de l'acide Poly(lactique-co-glycolique).....	14
Figure II.1 : Morphologie d'une microcapsule.....	18
Figure II.2 : Représentation schématique des différentes formes de microcapsules.....	19
Figure II.3 : Principe de l'encapsulation par coacervation.....	21
Figure II.4 : Préparation des microsphères par fusion à chaud.....	21
Figure II.5 : Procédé de microencapsulation par évaporation de solvant à partir d'une émulsion E/H.....	23
Figure II.6 : Mécanisme de formation des microparticules par polymérisation interfaciale...25	25
Figure II.7 : Différentes étapes de la fluidisation.....	26
Figure II.8 : Illustration de la méthode de diffusion sur boîte Pétri (ZAIKI, 1988).....	31
Figure III.1 : Dispositif expérimental.....	39
Figure III.2 : Observation des microsphères de PCL(M1) par microscope optique.....	40
Figure III.3 : Observation des microsphères de PLGA(M2) par microscope optique.....	40
Figure III.4 : Observation des microsphères de PLGA et PCL (M3) avec ER par microscope optique.....	41
Figure III.5 : La distribution en taille de M1.....	46
Figure III.6 : La distribution en taille de M2.....	46
Figure III.7 : La distribution en taille de M3.....	47

Figure III.8 : Spectre Infrarouge de M1.....	47
Figure III.9 : Spectre Infrarouge de M2.....	48
Figure III.10 : Spectre Infrarouge de M3.....	48
Figure III.11 : Spectre Infrarouge de ER.....	49
Figure III.12 : Le diffractogramme de ER.....	50
Figure III.13 : Le diffractogramme de M1.....	50
Figure III.14 : Le diffractogramme de M2.....	51
Figure III.15 : Le diffractogramme de M3.....	51
Figure III.16 : Courbe d'étalonnage de l'érythromycine à pH=1.2 (286).....	55
Figure III.17 : Courbe d'étalonnage de ER à pH=7.4 (268nm).....	55
Figure III.18 : Le dispositif expérimental de la libération du PA.....	56
Figure III.19 : Le taux de libération de M1 en fonction du temps.....	57
Figure III.20 : Le taux de libération de M1 en fonction du temps.....	57
Figure III.21 : Le taux de libération du PA de M3 en fonction du temps.....	58
Figure III.22 : Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide.....	60
Figure III.23 : Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé.....	60
Figure III.24 : Comparaison de McFarland 0,5 avec la suspension de l'inoculum. De gauche à droite, les tubes sont le standard McFarland 0,5, E. Coli ATCC 25922 ajusté à la turbidité McFarland 0,5 et la solution saline non inoculée.....	63
Figure III.25 : Inoculation des boîtes de Petri.....	64
Figure III.26 : Application des disques d'antibiotiques.....	64
Figure III.27 : Lecture des zones d'inhibition.....	65
Figure III.29 : Les 3 souches bactériennes Pseudomonas ; E. coli et S. aureus.....	66
Figure III.30 : La méthode de dilution en milieu liquide.....	67
Figure III.31 : Les diamètres d'inhibition obtenus pour S. aureus.....	67
Figure III.32 : Diamètre d'inhibition ER obtenu pour S. aureus.....	68
Figure III.33 : Aucun diamètre d'inhibition pour PSEUDO.....	68
Figure III.34 : Evolution des DO des souches S.aureus et Pseudomonas après 48h.....	69
Figure III.35 : Comparaison entre les diamètres et le pourcentage de la libération d'ER en fonction du temps.....	70

Liste des tableaux

Tableau III.1 : Propriétés physiques et chimiques de la PCL.....	35
Tableau III.2 : Propriétés physiques et chimiques de la gélatine.....	36
Tableau III.3 : Propriétés physiques et chimiques de ER.....	37
Tableau III.4 : Résultats granulométriques de M1.....	43
Tableau III.5 : Résultats granulométriques de M2.....	44
Tableau III.6 : Résultats granulométriques de M3.....	45
Tableau III.7 : Les diamètres moyens et la dispersion des microsphères.....	46
Tableau III.8 : Les valeurs des λ_{\max} et ε de l'érythromycine dans les différents milieux.....	55
Tableau III.9 : les diamètres obtenus pour S.aureus en fonction du pourcentage de la libération d'ER.....	69

Liste des abréviations

PCL : Polycaprolactone	ABS : Absorbance
PLGA : Poly (lactique-Co-glycolique) acide	DMC : Dichlorométhane
PET : Polyéthylène téréphtalate	M1 : Microsphères de PCL
PHA : Poly hydroxy alcoolate	M2 : Microsphères de PLGA
PHB : Poly-3-hydroxybutyrate	M3 : Microsphères de PLGA et PCL
PBSA : Poly butylène succinate-co-adipate	i : La classe des particules
PBAT : Polyadipate-co-butylène téréphtalate	n : Nombre de particules
PBS : Acrylonitrile-butadiène-styrène	d₁₀ : Le diamètre moyen en nombre
PLA : Poly lactique acide	d₃₂ : Le diamètre moyen en surface
PGA : Poly glycolique acide	d₄₃ : Le diamètre moyen en masse
CL : Caprolactone	t : Temps
PVA : Poly vinyle alcool	DO : Densité optique
PVC : Polychlorure de vinyle	H : Heure
T_g : Température de transition vitreuse	D : Diamètre d'inhibition
T : La température	M-H : Muller Hinton
PA : Principe actif	PK_a : Constante d'acidité
M_w : Masse en poids	MP : matrices polymère
MP : Microparticule	
UV-vis : UltraViolet- Visible	
E/H/E : Eau/huile/eau	
E/H : Eau/huile	
ER : Erythromycine	
E. coli : eshiréchia coli	
S. aureus :staphylococcus aureus	
CMI : Concentration minimale inhibitrice	
IR : Infrarouge	
DRX : Diffusion des rayons X	

Bibliographie

Chapitre I :

[1] Plastiques 2009 : faits et chiffres-Analyses de production, de la demande et de la valorisation des matières plastiques en Europe en 2008, 2009.

[2] Rabetafika H.N., Paquot M., Dubois P., les polymères issus du végétal : matériaux a propriétés spécifiques pour des applications ciblées en industrie plastique, Biotechnologie, Agronomy., Biodégradable polymers. Progress in polymer Science 1998 ; 23(7) :1273-353.

[3] Chandra R., Rustgi R., Biodégradables polymers. Progress in polymer science 1998 ; 23(7) ; 1273-353.

[4] Nair L.S., Laurencin C.T, Biodégradable polymers as biomaterials.Pr ogress in polymer Science 2007 ; 32(8-9) :762-98.

[5] Keller A, Wintermantel E., Riffieux L., Matériaux composites biodégradables Utilisation de fibres végétales .Chanvre info, Rapports FAT n° 503, 2003.

[6] Averous L., Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: a review .Journal of macromolecular Science –Part C, polymer Reviews 2004; vol C4 (N°3) :231-74.

[7] Doumene S., Les emballages biodégradables .Fiche technique emballage 2004, p.

[8] Averous L., biodégradables polymers (biopolymers), 2007.

[9] Satyanarayana K. G., Arizaga G. G C., Wypych F., biodegradables composites based on lignocellulosic fibres –An overview. Progress in polymer Science 2009 ; 34 (9) : 982-1021.

[10] Bewa H., Biodégradabilité et matériaux polymères biodégradables –Note de synthèse I.ADEME 2005 , 10

[11] Biodégradables plastics : développements and enviromental impacts. Prepared in association with Excelplas Australia , Melboume ,Nolan-ITU PTY LTD 2002, 66 p

- [12] shah A. A., Hasan F ., Hameed A., Ahmed S., biological dégradation of plastics :A comprehensive review . *Biotechnology Advances* 2008 ; 26(3) : 246-65.
- [13] Vert M., LI S.,Des polymères biodégradables mieux contrôlés pour des applications plus ciblées 1997 .
- [14] Leslie Howard Sperling –Introduction to physical polymer science 4th ed , John Wiley & Sons(2006)
- [15] Albertsson AC, vanma IK-Récent développements in ring opening polymerization of lactones for biomedical applications. *Biomacromolecules* 4(6) :1466-86,(2003).
- [16] S.Cometa, IBartolozzi ,A Chiellini ,E .De Giglio, E . Chiellini –Polymer Degradation and Stability 95,2013-2021,(2010) .
- [17] Cherdron Ohse ,Korte .F,- Synthesis and characterization of polylactones *Makromol. Chem* , 56,179,(1962)
- [18] Homfmann .A , Szyranski. R Slomkowski , Penczek –Structure of active species in the cationic polymerization of propiolactone and caprolactone,*Mackromol.Chem* .,185 ,655,(1984) .
- [19] Hofimann, Slomkoski S,- Structure of active centres and mechanism of anionic and cationic polymerization of lactones *Makromol. Chem*, 188, 2027,(1987) .
- [20] Tian HY , Deng C, Lin ,Sun JR, Deng Mx, Chen XS, -Biodegradable cationic PEG- PEI-PBLG hyperbranched blok copolymer : synthesis and micelle characterization.*Biomaterials* ; 26(3) :914-17, (2005).
- [21] Allison SD. Effect of structural relaxation on the preparation and drug release behavior of poly(lactic- co -glycolic)acid microparticle drug delivery systems. *J Pharm.* 2008; 97 :2022–2035.
- [22] Mohamed F, van der Walle CF. Engineering biodegradable polyester particles with specific drug targeting and drug release properties. *J Pharm.* 2008; 97 :71–87.

- [23] Cynthia D'Avila Carvalho erbeta, alves RJ, Magalhães Resende J, Freiyas RF de S, de Sousa RG. Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. *Scientific research*. janv 2012;3:208-25.
- [24] Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*. 1 sept 2011;3(3):1377-97.
- [25] Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release*. 11 févr 2008;125(3):193-209.
- [26] Zaghloul AA. beta-Estradiol biodegradable microspheres: effect of formulation parameters on encapsulation efficiency and in vitro release. *Pharmazie*. sept 2006;61(9):775-9.
- [27] Sperling LH. *Introduction to Physical Polymer Science*. John Wiley & Sons; 2005. 878 p.
- [28] Passerini N, Craig DQ. An investigation into the effects of residual water on the glass transition temperature of polylactide microspheres using modulated temperature DSC. *J Control Release*. 18 mai 2001;73(1):111-5.
- [29] Okada H, Doken Y, Ogawa Y, Toguchi H. Preparation of three-month depot injectable microspheres of leuprorelin acetate using biodegradable polymers. *Pharm Res*.
- [30] Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-coglycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*. déc 2000;21(23):2475-90. 1994;11(8):1143-7.
- [31] Shive, Anderson. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev*. 13 oct 1997;28(1):5-24.
- [32] Kitchell JP, Wise DL. [32] Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug—polymer matrix systems. In: Kenneth J. Widder RG, éditeur. *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 1985 [cité 30 août 2014]. p. 436-48. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687985120343>
- [33] Brady JM, Cutright DE, Miller RA, Battistone GC, Hunsuck EE. Resorption rate, route of elimination, and ultrastructure of the implant site of polylactic acid in the abdominal wall of the rat. *J Biomed Mater Res*. 1 mars 1973;7(2):155-66.

- [34] Agrawal CM, Niederauer GG, Athanasiou KA. Fabrication and Characterization of PLA-PGA Orthopedic Implants. *Tissue Eng.* 1995;1(3):241-52.
- [35] Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 janv 2010;75(1):1-18.
- [36] Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev.* 24 févr 2003;55(3):329-47.
- [37] Kreitz MR, Domm JA, Mathiowitz E. Controlled delivery of therapeutics from microporous membranes. II. In vitro degradation and release of heparin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials.* déc 1997;18(24):1645-51.
- [38] Chen X, Ooi CP. Hydrolytic degradation and drug release properties of ganciclovir-loaded biodegradable microspheres. *Acta Biomater.* juill 2008;4(4):1046-56.
- [39] Danny H, Lewis S. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. *Biodegradable polymers as Drug Delivery Systems* [Internet]. Mark Chasin and Rober Langer;[cité 31 août 2014]. p. 01-41. Disponible sur: http://www.ajprd.com/download ebooks_pdf/38.pdf
- [40] Engineer C, Parikh J, Raval A. Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs.* 4 mai 2011;25(2):79-85.
- [41] Holland SJ, Tighe BJ, Gould PL. Polymers for biodegradable medical devices. 1. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. *Journal of Controlled Release.* Oct 1986;4(3):155-80.
- [42] Lu L, Peter SJ, Lyman MD, Lai H, Leite SM, Tamada JA, Uyama S, Vacanti JP, Langer R, Mikos AG. *In vitro* and *in vivo* degradation of porous poly(-lactic- co -glycolic acid) foams. *Biomatériaux.* 2000; 21 :1837–1845.
- [43] Lu L, Garcia CA, Mikos AG. *In vitro* degradation of thin poly(D,L-lactic- co -glycolic acid) films. *J Biomed Mater Res.* 1999; 46 :236–244.
- [44] Park TG. Degradation of poly(lactic- co -glycolic acid) microspheres: Effect of copolymer composition. *Biomatériaux.* 1995; 16 :1123–1130.

- [45] Park TG. Degradation of poly (D,L-lactic acid) microspheres: Effect of molecular weight. *J Control Release*. 1994; 30 :161–173.
- [46] Liggins R. Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres: Properties of microspheres made with low molecular weight polymers. *Int J Pharm*. 2001; 222 :19–33.
- [47] Schliecker G, Schmidt C, Fuchs S, Wombacher R, Kissel T. Hydrolytic degradation of poly(lactide- *co* -glycolide) films: Effect of oligomers on degradation rate and crystallinity. *Int J Pharm*. 2003; 266 :39–49.
- [48] Witt C. Morphological characterization of microspheres, films and implants prepared from poly(lactide- *co* -glycolide) and ABA triblock copolymers: Is the erosion controlled by degradation, swelling or diffusion? *Eur J Pharm Biopharm*. 2001; 51 :171–181.
- [49] Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. *Biomatériaux*. 1995; 16 :305–311.
- [50] Alexis F. Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly (lactic acid) and poly [(lactic acid)- *co* -(glycolic acid)] *Polym Int*. 2005; 54 :36–46.
- [51] Cai Q, Shi G, Bei J, Wang S. Enzymatic degradation behavior and mechanism of poly(lactide- *co* -glycolide) foams by trypsin. *Biomatériaux*. 2003; 24 :629–638.
- [52] Li S, Girard A, Garreau H, Vert M. Enzymatic degradation of polylactide stereocopolymers with predominant-lactyl contents. *Polym Degrad Stab*. 2000; 71 :61–67.
- [53] Zolnik BS, Burgess DJ. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *JControl Release*. 8 oct 2007;122(3):338-44

Chapitre II :

- [1] Hidekazu Yoshizawa, Trends in Microencapsulation Research, KONA No22, 2004)
- [2] Archady R, biodegradable microencapsular drug delivery systems, manufacturing methodology, release control and targeting projects, Journal of bioactive and compatible polymer, Vol 5, 315-342, 1990.)
- [3] Marie Socha, Apport des nanotechnologies dans le domaine des peptides et des protéines : Application à l'absorption par voie orale et à la furtivité, thèse, Université Henri Poincaré, 2008.
- [4] Guang Long Zou, Zhi Cheng Tan, Xiao Zheng Lan, Li Xian Sun, Tao Zhang, Preparation and Characterization of Microencapsulated Hexadecane Used for Thermal Energy Storage, Chinese Chemical Letters Vol. 15, No6, 729-732, 2004).
- [5] Joël Richard, Jean-Pierre Benoît, Microencapsulation, Technique d'ingénieur, J 2210.)
- [6] Tewes F., Boury F. and Benoit J.P., Biodegradable Microspheres: Advances in Production Technology in Microencapsulation, Methods and Industrial Applications, Second Edition - Benita eds Taylor and Francis Books (in press).
- [7] S. S. Bansode, S. K. Banarjee, D. D. Gaikwad, S. L. Jadhav, R. M. Thorat, Microencapsulation: A Review, Vishal Institute of Pharmaceutical Education and Research, Vol 1, Article 008, ISSN 0976 – 044X, 2010
- [8] Bojana Boh, Bostjan Sumiga, Microencapsulation technology and its applications in building construction materials, RMZ – Materials and Geoenvironment, Vol. 55, No. 3, 329-344, 2008.
- [9] A.Bhattacharyya and J.F.Argillier, microencapsulation by complex coacervation: Effet of cationic surfactants, J. surface Sci.technol, Vol 21, N° 3 - 4, PP 161-168, 2005.
- [10] P.Buri ; F.Puisieux ; E.Doelker : formes pharmaceutiques nouvelles Edition : Paris ,Technique et documentation ; 1985.
- [11] Rama Dubey, T.C. Shami and K.U. Bhasker Rao, Microencapsulation Technology and Applications, Defence Science Journal, Vol. 59, No. 1, 82-95, 2009.

- [12] Seyed Ali Hashemi, Mojgan Zandi , Encapsulation Process in Synthesizing Polyurea Microcapsules Containing Pesticide, *Iranian Polymer Journal* , Vol 10; N° 4, 2001.
- [13] Billot, Genevière Bernadette, Teichner Marc Maurie, Procédé de préparation de microsphères pour la libération prolongée de l'hormone LHRH et ses analogues, microsphères et formulation obtenues, Office européen des brevets, EP 0585 151 B1, 2000.
- [14] Alfonso, R. G., Remington: The Science of Practice Of Pharmacy, Vol-2, 890-891.
- [15] Klimenberg, J. R.; Goldfinger, S. E.; Seegmiller, J. E. *Ann. Intern. Med.* **1965**, 62,639.
- [16] Marr, J. J.; Berens, R. L. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1983**, 6, 323.
- [17] Moukha-chafiq. O , Taha. M.L , H. B. Lazrek , J.J. Vasseur, C. Pannecouque,M. Witvrouw, E.D.Clercq. *Il Farmaco.* **2002**, 57 , 27.
- [18] J. Metzner, E. Lippmann, F.G. Weber et G. Westphal; *Pharmazie*, **1981**, 36, 388.
- [19] L.E. Seitz, W.J. Suling et R.C. Reynolds; *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 5604.
- [20] Zaika.L.L., *J. Food Safety.*, **1998**,9,97.
- [21] Smith. M.D , P.L. Navilliat, *J.Microbiol.Meth*, 28, **1997**, 21.
- [22] C.M. Mann, Markham. J.L, *J.Appl. Microbiol*, 84, **1998**, 538.
- [23] Lahlou. M, *Phytotherap. Research*, 18, **2004**, 435.
- [24] Belier- Maurel. M.F, *Rivista Italia*, **2000**,58, 283.
- [25] Fauchère. J.L, L. Avril, «*Bactériologie générale et médicale* », *Ellipses*, **2002**.
- [26] Tharib. S.M, Gnan.S.O., Veitch. G.B.A. , *J.Food. Prot.*,**1998**, 48, 681.
- [27] Deans. S.G., G.Ritchie, *Int. J.Food Microbiol*, **1987**, 5, 162.
- [28] Lis- Balchin.M , Hart. S.L., *Phytotherap. Research*, **2000**, 14, 623.
- [29] Burt. S.A, Reinders. R.D, *Lett. Appl. Microbiol.*, **2003**,36, 162.
- [30] Faleiro.M.L., Miguel. M. G., *Lett. Appl. Microbiol.*,**2003**, 36, 35.

ANNEXES

Résumé :

Ce travail consiste dans la première partie en l'étude de la cinétique de libération érythromycine un antibiotique, dans deux pH=7.4 (intestinal) et pH=1.2 (stomacal) reconstitués. La cinétique de libération a été effectuée à 37°C. Le relargage du principe actif est réalisé à partir des microsphères préparées par évaporation de solvant, en utilisant une émulsion simple. Trois formulations ont été synthétisées :

Microsphères ne contenant aucun principe actif à base de du poly-ε-caprolactone (80.000g/mol).

Microsphères ne contenant aucun principe actif à base poly (acide lactique-co- glycolique).

Microsphères constituées de blend polymères : le poly-ε-caprolactone et poly (acide lactique-co-glycolique) contenant l'érythromycine.

L'étude cinétique des trois formulations montrent que la libération de l'érythromycine est très rapide dans les premiers temps est se trouve plus favorable dans le pH=7.4. Les microsphères ont été caractérisées par spectroscopie I.R, DRX.

La deuxième partie, concerne l'étude de l'activité antibiotique par la méthode de diffusion par disques, avec trois souche standardisées ;E. Coli, S.aureus, Pseudomonas

Les diamètres d'inhibitions, ont été calculés et une C.M.I a été évaluée pour les prélèvements positifs, nous avons constaté que la E.coli, Pseudomonas sont des souches résistantes et S.aureus une souche sensible, les résultats obtenus sont en accord avec la littérature, et l'inhibition des souches est retardée par les microsphères, en comparaison avec l'érythromycine seul.

Abstract :

This work consists in the first part in the study of the release kinetics erythromycin an antibiotic, in two reconstituted pH=7.4 (intestinal) and pH=1.2 (stomacal). The release kinetics were performed at 37 °C. The release of the active principle is carried out from the microspheres prepared by evaporation of solvent, using a simple emulsion.

Three formulations have been synthesized:

Microspheres containing no active ingredient based on poly-ε-caprolactone (80,000 g / mol).

Microspheres containing no active principle based on poly (lactic acid-co-glycolic acid).

Microspheres made up of blend polymers: poly-ε-caprolactone and poly (lactic-co-glycolic acid) containing erythromycin.

The kinetic study of the three formulations show that the release of erythromycin is very rapid in the early times and is found to be more favorable in PH=7.4. Microspheres were characterized by I.R, DRX spectroscopy.

The second part concerns the study of the antibiotic activity by the disk diffusion method, with three standardized strains: E.coli, S.aureus, Pseudomonas

Inhibition diameters were calculated and a MIC was evaluated for positive samples, we found that E.coli, Pseudomonas are resistant strains and S.aureus a susceptible strain, the results obtained are in agreement with the Literature, and inhibition of strains is delayed by microspheres, in comparison with erythromycin alone.

ملخص:

يتمحور هذا العمل في جزئه الأول في النظر في الايريثروميسين حركية الافراج عن المضادات الحيوية في وسط pH = 7.4 و pH = 1.2 أعيد تشكيلها. حركية الإفراج نفذت في 37 °C درجة. يتم تشكيل الافراج عن مبدأ نشط من المجهرية عن طريق التبخر المذيبات ، وذلك باستخدام مستحلب بسيط وتم توليفها ثلاث صيغ.

وتشير الدراسة الحركية من ثلاثة تركيبات ان الافراج الايريثروميسين سريع جدا في المرة الأولى هو أكثر ملائمة في pH = 7.4 ودرست بالتحليل الطيفي IR، XRD.

الجزء الثاني يتعلق بدراسة نشاط المضاد الحيوي عن طريق أسلوب نشر القرص مع ثلاثة سلالات القياسي : E.coli, S.aureus, Psodomonas.

وحسبت الأقطار وتم تقييم CMI للعينات إيجابية، وجدنا أن Psodomonas و E.coli هي سلالات مقاومة و S.aureus هي سلالة عرضة، وكانت النتائج في اتفاق مع الدراسات السابقة.

Mots Clés : microsphères, évaporation de solvant, PCL, PLGA, érythromycine, activité antibiotique.