



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

Mémoire

Présenté par :
BELHADJ NAÏMA & BEN HALIMA KHADIDJA

Pour obtenir le diplôme de

Master II

Filière : Chimie

Spécialité: *Chimie ORGANIQUE*

Sujet :

Etude de l'activité antibiotique et antioxydante de l'érythromycine et la quercitine à partir des microsphères

Soutenu le : 24/06/2018

Devant le jury:

Mme H.baleh	Présidente	UNIV .Tiaret
Mr B.DAHO	Examineur	UNIV .Tiaret
Mr M.DEBDAB	Examineur	UNIV .Tiaret
Mme L.BENNABI	Encadreur	UNIV .Tiaret
Mme I.ABEDELEMALEK	CO-Encadreur	UNIV .Tiaret

Remerciements

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de

Melle LAMIA BENNABI (MCB) à UNIV IBN KHALDOUN TIARET, on la remercie pour la qualité de son

encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nous sommes conscientes de l'honneur que nous a fait en étant

MLLE.BALAHE (MAA) à UNIV IBN KHALDOUNAprésident du jury

et**MR.DEBDAB (MCA) à UNIV IBN KHALDOUN TIARET**

et**MR.DAHOU(MCA) à UNIV IBN KHALDOUN TIARET**

d'avoir accepté d'examiner ce travail

Un grand merci pour madame **L.ABEDELEMALEK (MCB)UNIV IBN**

KHALDOUN 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.

Sommaire

Introduction générale.....1

Etude bibliographique

Partie I : Les polymères biodégradables

I.1. Les polymères biodégradables.....3

I. 1.1. Historique des polymères biodégradables3

I.1.2.Applications des polymères biodégradables4

I.1.3.Classification des biopolymères.....5

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

I. 2.1. Introduction.....7

I. 2.2. Définition.....8

I.2.3.Biodégradation de la PCL8

I. 2.4. Biocompatibilité et toxicité9

I. 2.5. Synthèse de la PCL.....9

Partie II : Microencapsulation.....13

II. 1. Introduction.....13

II. 2. Définition13

II.3. classification des microparticules13

II. 4. Technique d'encapsulation.....14

II. 4.1. Introduction14

II. 4.1. Les différents procédés de microencapsulation.....15

II.4.2.a) Procédés physico-chimiques.....15

II.4.2.b) Procédés mécanique.....	18
II.4.2.c) Procédés chimiques.....	19
II. 5. Techniques de caractérisation des microcapsules	21
II. 6. Application de la microencapsulation.....	21
Partie III: L'activité Antioxydante et antibiotique.....	24
III. 1. Radicaux libres.....	24
III. 1. 1. Définition.....	24
III. 1. 2. Origine des radicaux libres.....	24
III. 1. 3. Nature des radicaux libres.....	24
III. 1.3.a) Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO).....	24
III. 1.3.b). Espèces libres non oxygénées.....	25
III. 2. Antioxydants	25
III. 2. 1. Définition.....	25
III. 2. 2. Mécanisme d'action.....	26
III. 2. 3. Utilisation des antioxydants.....	26
III. 2. 4. Classification des antioxydants.....	26
III. 2.4.a) Antioxydants synthétiques.....	26
III. 2. 4.b) Substances synergiques.....	28
III. 2. 4. C) Antioxydant d'origine végétale.....	28
III. 2.5.Evaluation de la capacité antioxydante par des tests in vitro	29
III. 2. 5.1. Test TEAC (ou ABTS)	29
III. 2. 5.2. Test ORAC	29
III. 2. 5.3. Test DPPH.....	29
III. 3. L'activité antibiotique :.....	29
III. 3.1. Introduction.....	29
III. 3.2. Micro-organismes utilisés.....	30

II.3.3.Les Antibiotiques	31
II. 3.3. 1. Paramètres d'activité d'un antibiotique.....	31
II. 3.3. 2.Méthodes d'étude de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques.....	31
II. 3.4.Techniques d'études in vitro du pouvoir antimicrobien	32
II. 3.4.1. Technique d'étude en vapeur.....	32
II. 3.4.2. Technique d'étude sur milieu solide.....	32

Etude Expérimentale

Partie I : Synthèses et Caractérisations	34
---	----

I.1. Synthèse physico-chimique des microsphères34

I. 1.1. Identification des produits.....	34
I. 1.2. Mode opératoire.....	39

I.2. Caractérisation des microsphères.....40

I. 2.1. Distribution de taille.....	41
I. 2.2. Spectroscopie Infrarouge.....	41
I. 2.3. Par DRX	42

I.3. Etude de la cinétique de la libération de principe actif dans le pH=1.2 et le pH=7.4.....43

I. 3.1. Facteurs influençant les transferts de matières.....	43
I. 3.2. Conditions de mesures	43
I 3.3. Mode opératoire.....	48
I. 3.4. Résultats de la cinétique de libération.....	49

I. 4. Microscopie électronique à balayage (MEB).....50

I. 5. Résultats Caractérisation des microsphères.....52

I. 5. 1. Distribution de taille.....	52
I. 5. 2. Spectrophotomètre infrarouge à transformé de Fourier.....	54

I. 5. 3. Diffraction des rayons X (DRX).....	56
Partie II : L'activité antioxydants et antibiotique.....	57
II. 1. L'activité antioxydants.....	59
II. 1.1. Introduction	59
II. 1. 2.Évaluation de pouvoir antioxydant	59
II. 1.3. Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1- picrylhydrazyl) ...	57
II. 1.4.Mise en œuvre pratique	60
II. 1.4.1préparation de solution DPPH	60
II. 1.4.2.mode de opératoire	60
II. 1.5.L'étude du pouvoir antioxydant	61
II. 1.5.1.Etude des prélèvements cinétiques en DPPH.....	61
II. 2. L'activité antibiotique.....	62
II. 1. Introduction.....	62
II. 2. Antibiogramme.....	63
II.2.1. Méthodes de dilution.....	63
II. 2.2. Méthode de la diffusion en disque.....	65
II. 3. Mode opératoire	69
II. 3.1. Préparation de la suspension	70
II. 3.2. La méthode de dilution en milieu liquide	70
II. 3.3. La méthode de diffusion par disque	70
III Résultats et	
disussion	74

Introduction générale

Ces dernières années, les polymères biodégradables ont fait l'objet d'une attention considérable: des millions de produits biopharmaceutiques pharmaceutiques sont présents sur ces polymères chaque année, les plus importants étant les polymères biodégradables les poly(esters) aliphatiques Les poly (esters) aliphatiques sont aujourd'hui très disponibles en raison de leurs propriétés biodégradables positives.

L'un des polymères les plus utilisés, qui est l'un des polystyrènes aliphatiques les plus biodégradables en raison de sa perméabilité en médecine, est l'un des premiers polymères utilisés pour la fabrication de fils chirurgicaux utilisables par les organismes vivants (humains et animaux).

En effet, ces caractéristiques en ont fait des polymères très intéressants afin d'obtenir des 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.

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 des propriétés spécifiques.

Dans ce travail, se compose de deux parties :

La première se présente en la partie bibliographique ou nous avons fais une synthèse des points suivants :

- ✓ Les polymères biodégradables.
- ✓ La microencapsulation des molécules actives
- ✓ Une recherche sur l'activité antibiotique et l'activité antioxydante

Dans la seconde partie expérimentale on s'est concentré un premier temps sur l'encapsulation de PA : érythromycine et la quercitrine par la méthode d'évaporation de solvant en utilisant comme matrices un polymère biodégradable : la PCL.

La procédure se fait suivant un mécanisme physique et des conditions physicochimiques (PH, volume du solvant utilisé, vitesse d'agitation, température).

Ensuite nous avons étudié l'activité antibiotique et antioxydante des microsphères avec des souches référenciées : Ecoli, Stap ,Pseudo

Introduction générale

On termine notre travail avec une conclusion tiré à partir des résultats du travail de cette recherche effectué et des perspectives pour un travail avenir .

Chapitre 1 :

Etude bibliographique

Partiel : Les polymères biodégradables

I. 1. Les polymères biodégradables :

I. 1.1. Historique des polymères biodégradables :

L'industrie des plastiques a commencé à chercher d'autres sources de matières premières au cours des dernières décennies et les solutions naturelles et renouvelables suscitent un intérêt considérable [1]. Les biopolymères sont des produits de sources naturelles ou renouvelables, ils présentent de nombreux avantages environnementaux comme une diminution de la pollution. Bien que le terme « biopolymères » soit utilisé de plusieurs manières différentes selon le domaine d'application, la définition généralement acceptée couvre les polymères qui appartiennent aux catégories qui sont soit renouvelables, biodégradables ou les deux.

Il existe deux types de polymères qui subissent une biodégradation [2] :

a. Les bio polymères :

Ces macromolécules synthétisées par un organisme vivant sont appelées biopolymères. Certains d'entre eux sont l'ADN, l'ARN, les protéines, les lipides, les hydrates de carbone ayant un rôle spécialisé et ils fournissent également une intégrité structurelle dans le système biologique.

Sur la base du groupe fonctionnel, ils sont classés comme polypeptides (protéines), polysaccharides (hydrates de carbone) ou polyphénols. La plupart des biopolymères sont extraits de la biomasse.

b. Les bioplastiques :

Les bioplastiques sont des produits synthétisés à partir de biomasse renouvelables telles que des extraits de légumes, de la canne à sucre, de l'amidon alimentaire, des sous-produits agricoles [3]. Les bioplastiques principaux sont des matériaux à base de polysaccharides, des études ont été également menées sur l'addition ou les mélanges de matériaux à base de protéines dans des polysaccharides. Le polyéthylène (PE), Le polypropylène (PP) sont des plastiques non dégradables et hydrophobes en raison de sa structure hydrocarbonée. Par conséquent, il est naturellement incompatible avec l'amidon hydrophile et la poudre de soja. A ce titre, divers

Chapitre I

comptabilisant ont été utilisés pour améliorer l'adhésion interfaciale entre le PE et les polysaccharides ou les polymères naturels à base de protéines [4]. Les bioplastiques à base de tartre peuvent être fabriqués à partir d'amidon brut ou modifié (par exemple amidon thermoplastique ou TPS) ou à partir de la fermentation de sucres dérivés de l'amidon (par exemple l'acide polylactique ou PLA). Les sources courantes d'amidon comprennent le maïs, le blé, les pommes de terre et le manioc[5].

I.1.2.Applications des polymères biodégradables :

La plupart des bioplastiques sont utilisés dans l'emballage comme les bouteilles, les films, les déchets et les cartons. Ceux-ci sont également utilisés dans la fabrication des sacs poubelles, et pour autres emballages de légumes, de fruits, et divers produits. Ils sont également utilisés dans les films de paillis et les ustensiles de service alimentaire tels que les couteaux, les pièces automobiles mineures et les boîtiers électroniques.

Les bioplastiques à base d'amidon sont utilisés pour fabriquer des articles de service alimentaire. L'amidon mélangé avec des polymères à base de pétrole brut est utilisé pour des sacs de transport.L'amidon extrudé peut remplacer l'emballage en vrac en polystyrène expansé. Les produits de fermentation de l'amidon tels que l'acide poly lactique (PLA) sont utilisés dans les tasses et les bouteilles de boissons froides, les films et les récipients d'emballage alimentaire, les tapis et les vêtements. PLA peut également être utilisé pour fabriquer des CD et des boîtiers électroniques.

Le polycaprolactone (PCL) est facile à traiter et avec un temps de dégradation très court. Il n'est pas utilisé pour l'application alimentaire, mais s'il est mélangé avec de l'amidon, il est possible d'obtenir un bon matériau biodégradable à bas prix, utilisé pour les sacs poubelles.

LesPolyesters PET sont couramment utilisés pour manger des ustensiles (fourchette, couteau, cuillère, vaisselle, etc.) et des bouteilles.

Les polyéthylènes et les polyuréthanes sont utilisés en orthopédie, tendons artificiels, cathéters, greffes vasculaires, reconstruction faciale et des tissus mous. Le polyéthylène haute densité (HDPE) utilisé dans les bouteilles pharmaceutiques, tissus, sacs, sachets, tubes, etc.

Le polyméthacrylate de méthyle (PMMA, plexiglas) est utilisé dans les restaurations dentaires, dans les membranes pour dialyse, les lentilles oculaires et les lentilles de contact ciments osseux.

Chapitre I

Le polychlorure de vinyle (PVC) est utilisé dans les sacs de sang et de solution, l'ensemble d'emballage, les dispositifs de dialyse, le cathéter, et les canules [6].

Le poly-3-hydroxybutyrate (PHB) a la propriété avantageuse d'être dégradé en D-3-hydroxybutyrate, constituant naturel du sang humain. En conséquence, le PHB convient aux applications biomédicales. Il est utilisé dans les transporteurs de médicaments et les échafaudages de génie tissulaire [7]. Composites en CFRC, auto-renforcés ou hybrides sont utilisés en orthopédie, échafaudages.

Les hydrogels de la cellulose, les copolymères acryliques sont utilisés dans l'administration de médicaments, les implants vitreux, la cicatrisation des plaies [8].

I.1.3. Classification des biopolymères :

Selon l'origine des matières premières et des voies de synthèse, différentes classifications de polymères biodégradables sont proposées. La **figure 1** permet de distinguer deux grandes familles de polymères biodégradables: les agro-polymères et les polyesters biodégradables [9-11].

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...) [9,12].

Les polyesters biodégradables sont, soit produits par des microorganismes, soit issus de monomères bio-dérivés ou de la pétrochimie. Comme le montre la **figure 1** [13], 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 [14].

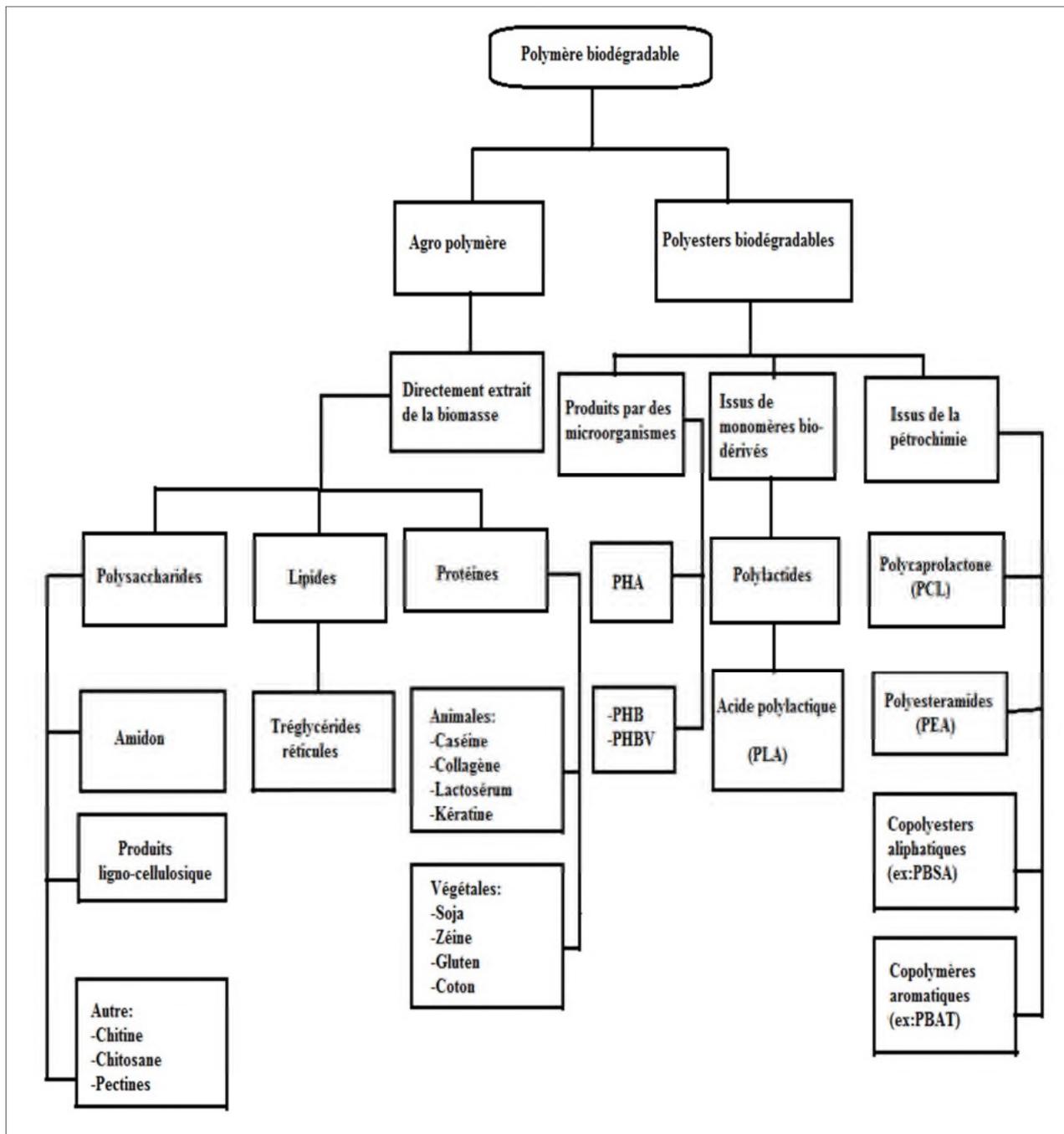


Figure.1 : Classification des polymères biodégradables

Les polyesters aliphatiques bio-sources, en revanche, sont facilement biodégradables, mais leurs propriétés mécaniques sont parfois insuffisantes pour certaines applications. La plupart des

Chapitre I

polyesters aliphatiques synthétiques sont préparés à partir des diols et des acides dicarboxyliques par l'intermédiaire d'une polymérisation de condensation (**Figure 2**)[13].

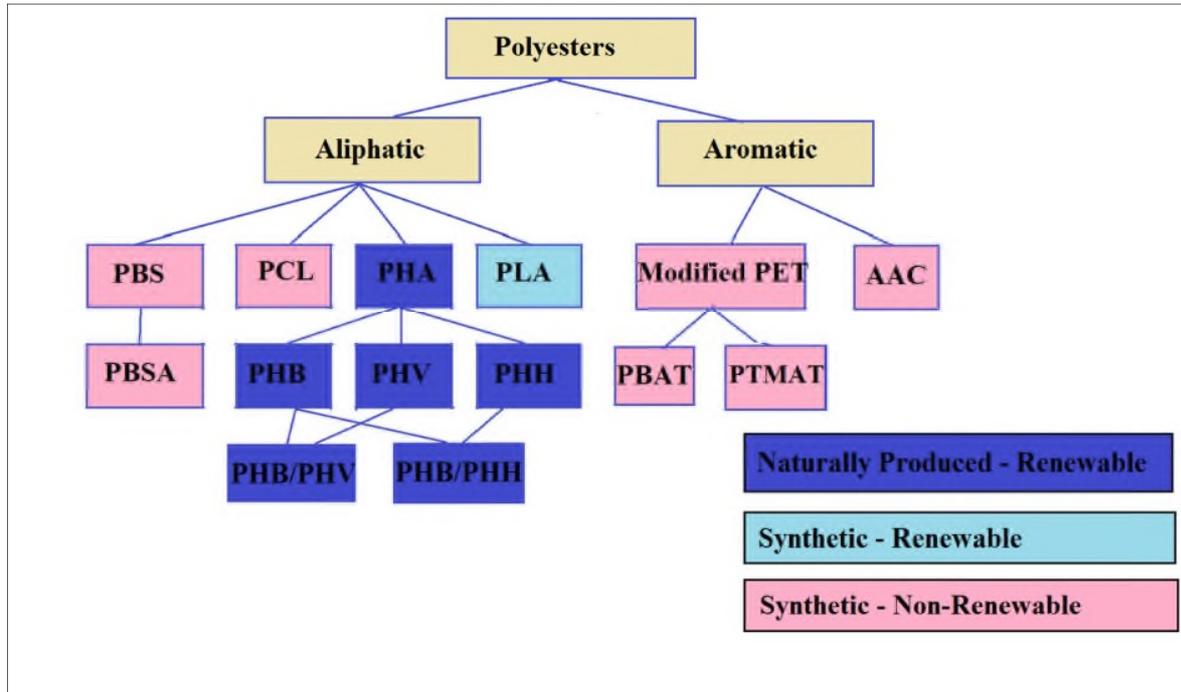


Figure 2 : Les familles des polyesters biodégradables

I. 2. La polycaprolactone :

I. 2.1. Introduction :

Parmi les polyesters aliphatiques, les plus couramment utilisés de nos jours pour des applications médicales, en particulier le poly (lactide) (PLA), le poly (glycolide) (PGL), la poly (ϵ -caprolactone) (PCL) et leurs copolymères. Le PCL peut être obtenu par polymérisation d'ouverture de cycle de la lactone correspondante à l' ϵ -caprolactone. Des réactions de polycondensation, permettant l'obtention de la PCL nécessitent des températures élevées (supérieures à 180 °C) avec des temps de polymérisation très longs et une élimination des sous-produits pour finalement ne conduire qu'à des polyesters de masses molaires peu élevées[15].

Chapitre I

L'homopolymère PCL a une dégradation totale de deux à quatre ans (selon le poids moléculaire de départ du dispositif ou de l'implant) [19].

I. 2.4. Biocompatibilité et toxicité :

Les biomatériaux, en particulier ceux qui sont absorbables et biodégradables, subissent des tests et des caractérisations rigoureuses avant qu'ils soient appliqués comme dispositif biomédicaux ou vecteurs de médicaments [20].

En raison de la biocompatibilité et la nature de la biodégradabilité de PCL, elle est largement étudiée pour les applications contrôlées d'administration de médicaments et d'ingénierie tissulaire dans plusieurs formulations. Sa compatibilité avec un large éventail de médicaments permet une répartition uniforme du médicament dans la matrice de formulation et sa dégradation à long terme facilite la libération des médicaments jusqu'à 7 à 8 mois. Il est de nature non toxique et se révèle d'être compatible avec plusieurs tissus du corps qui en fait un matériau idéal pour l'ingénierie tissulaire [21].

I. 2.5. Synthèse de la PCL :

Ces dernières années, des efforts considérables ont été faits pour développer de nouveaux catalyseurs efficaces pour la polymérisation par ouverture de cycle de l' ϵ -caprolactone, pour la synthèse de la poly (ϵ -caprolactone) avec un poids moléculaire contrôlé. Jusqu'ici, ces catalyseurs sont à la base de divers métaux tels que l'aluminium, le titane, le zinc, l'étain, et les métaux de type terres rares [22,23]. Industriellement, la poly(ϵ -caprolactone) est produite par Solvay Interox en Angleterre (Capa[©]), Dow/Union Carbide aux USA (Tone[©]) ou encore Daicel au Japon (Celgren[©]).

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 3).

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 transestérifications intermoléculaires (Figure 4, Figure 5)

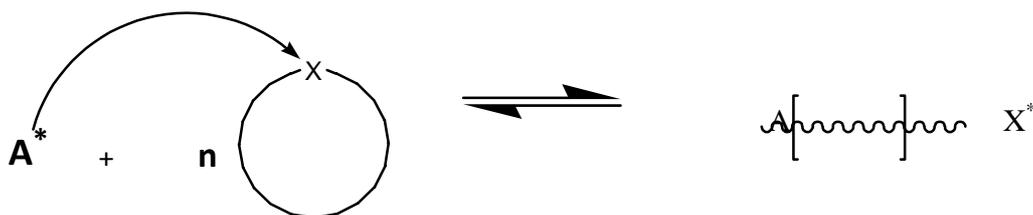


Figure.3: schéma général d'une polymérisation par ouverture de cycle.

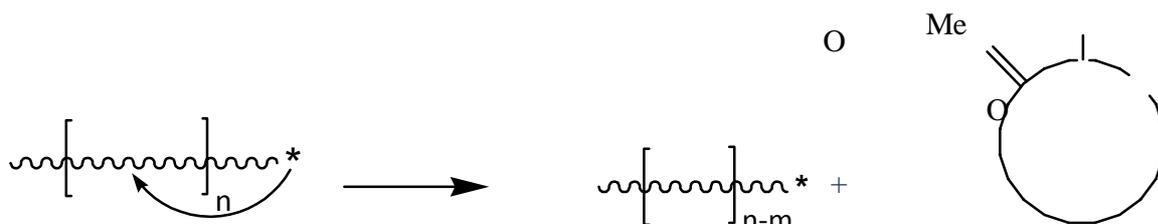


Figure 4 Réaction de rétroscission

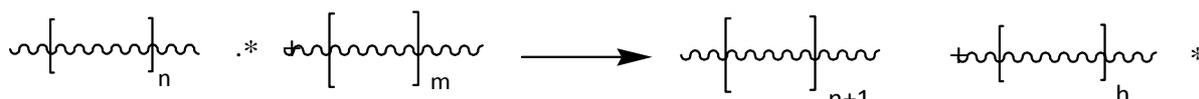


Figure 5 :Réaction de redistribution

Depuis les années soixante, de nombreuses études ont été menées. Selon les amorceurs utilisés, la polymérisation par ouverture de cycle de l' ϵ -caprolactone peut s'effectuer selon différents mécanismes (cationique, anionique, coordination) que nous décrivons dans la suite de ce chapitre.

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)

Chapitre I

Le mécanisme de la polymérisation cationique des lactones avait d'abord été proposé par Cherdron et al. [24]. 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 acylcarbonium susceptible de propager la réaction. Ce mécanisme a été remis en cause par Penczek et al. [25] 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.6**) [26].

En ce qui concerne la polymérisation de l' ϵ -caprolactone, le mécanisme est le suivant

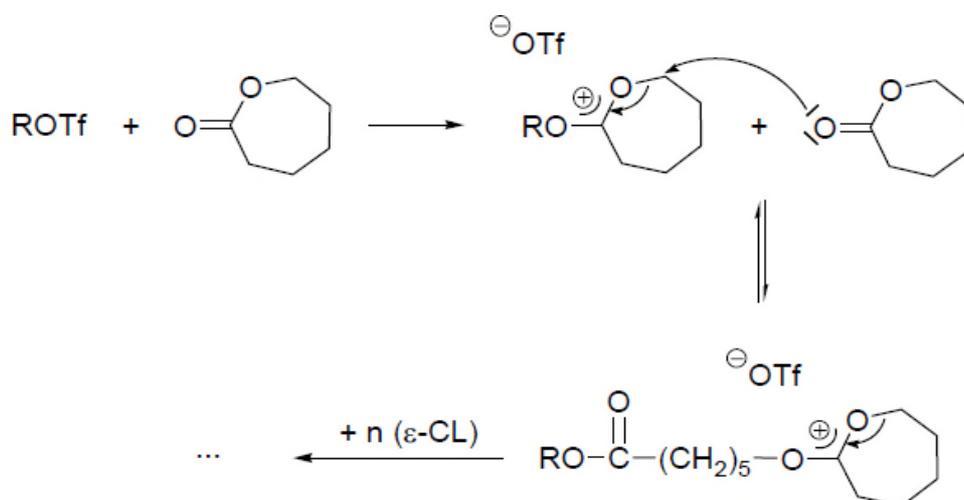


Figure 6 : Mécanisme de la polymérisation cationique de l' ϵ -caprolactone proposé par Penczek et al. [25]. MeOTf : méthyltrifluorométhanesulfonate

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

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 (**Figure7**). Ce mécanisme a été confirmé par les études d'Hofman [26] et de Kricheldorf [27].

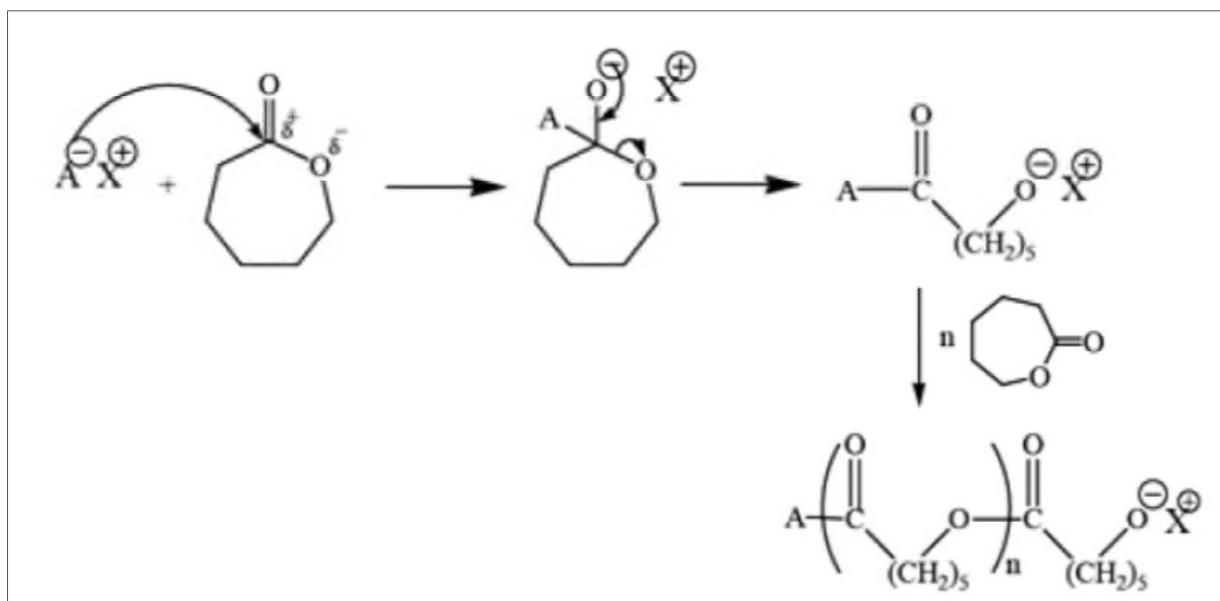


Figure 7 : Mécanisme de polymérisation anionique par ouverture de cycle de l' ϵ - caprolactone.

II. 1. Introduction:

L'encapsulation permet la préparation de diverses microparticules, elle consiste à encapsuler selon un procédé déterminé un principe actif dans une autre matière inactive afin d'améliorer les propriétés de conservation, de présentation et de biodisponibilité [28].

II. 2. Définition :

La microencapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active.

Les microparticules présentent une taille comprise entre 1 μm et 1 mm et contiennent typiquement entre 5 et 90 % (en masse) de matière active :

Les matières actives qui sont d'origines très variées (principes actifs pharmaceutiques, produits cosmétiques, additifs alimentaires, produits phytosanitaires, essences parfumées, micro-organismes, cellules, ou encore catalyseurs de réaction chimique...).

Les matériaux enrobants qui sont des polymères d'origine naturelle ou synthétique, ou des lipides [28]. Comme le précisent Boh et Sumiga[29], la substance encapsulée peut se présenter sous la forme de fines particules de solide divisé, d'un liquide, ou encore d'un composé gazeux.

II.3. classification des microparticules :

Il existe deux types de microparticules qui diffèrent par leur microstructure (**Figure 8**) [30] :

La microcapsule, particule sphérique de type « cœur -membrane » ; le cœur constitué de la substance active et la membrane de l'agent encapsulant qui forme l'enveloppe solide.

La microsphère, constituée d'un réseau polymère dans lequel la substance active est dispersée à l'état moléculaire ou particulaire (structure dite de type matriciel).

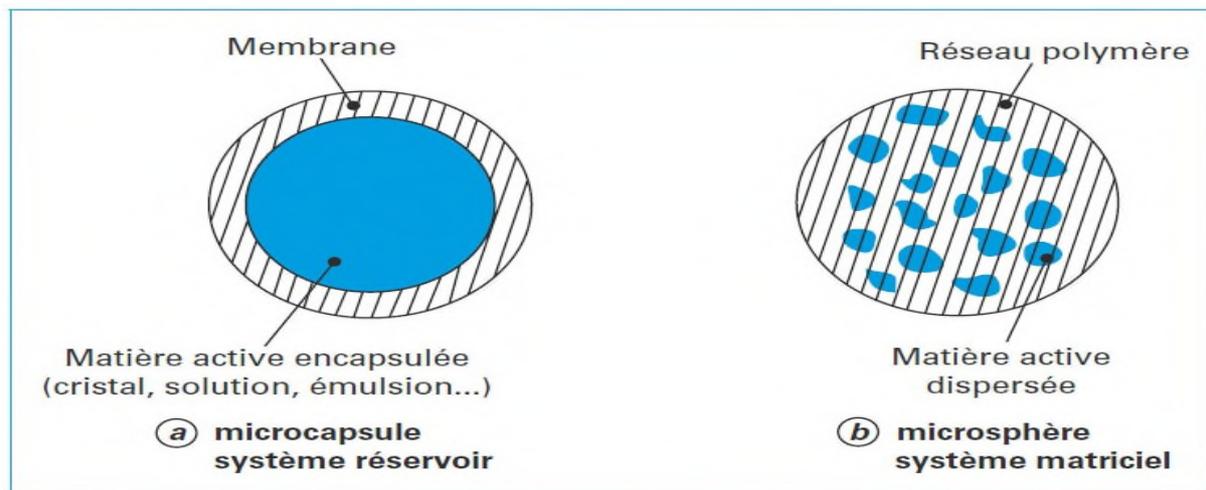


Figure 8: Schéma représentant la morphologie des microparticules [28].

Un certain nombre de facteurs physico-chimiques, permettent de caractériser la membrane d'une microcapsule ou la matrice d'une microsphère :

- Charge électrique de surface;
- Mouillabilité;
- Porosité;
- Tortuosité des pores;
- Degré de gonflement.

Le taux d'encapsulation (ou la teneur en matière active) peut être très élevée dans les microcapsules, de l'ordre de 85 à 90 % (rapport massique). Comparés à ceux rencontrés dans les microsphères qui sont plus faibles, de l'ordre de 20 à 35 % [28].

II. 4. Techniqued'encapsulation

II. 4.1. Introduction :

Les différentes méthodes de microencapsulation peuvent être classifiées selon différents critères [28]. Richard et Benoit (2000) proposent quatre manières différentes de classer les méthodes d'encapsulation :

Les procédés peuvent être classés selon l'emploi ou non de solvant organique, certaines techniques telles que la coacervation complexe utilisant des fluides supercritiques.

La nature du milieu dispersant peut également servir de base à une classification: il peut être liquide (polycondensation interfaciale, coacervation ...), gazeux (spray drying, enrobage en lit fluidisé, ...), ou encore à l'état supercritique (séparation de phase, ...).

La famille à laquelle appartient le composé employé pour obtenir la capsule peut également permettre de classer les modes d'encapsulation : peuvent être utilisés des polymères préformés (coacervation...), des lipides (spray- congealing, ...), ou encore des monomères (polycondensation interfaciale, polymérisation en milieu dispersé, ...).

Enfin, une dernière classification repose sur la nature du principe selon lequel est réalisée la microencapsulation: on distingue les procédés physico-chimiques des procédés chimiques et mécaniques[28-31].

II. 4.2. Les différents procédés de microencapsulation :

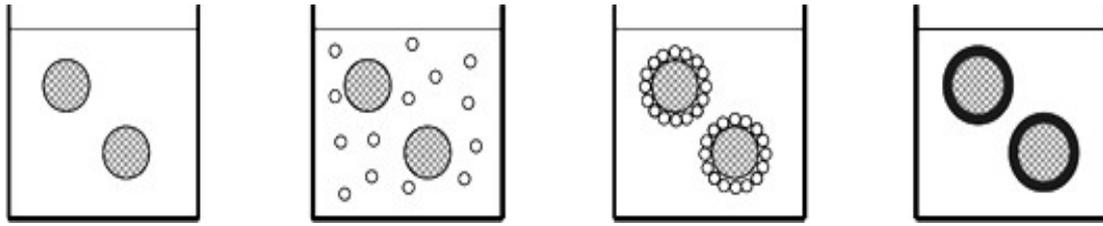
II.4.2.a) Procédés physico-chimiques:

➤ 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 [32].

Le procédé d'encapsulation par coacervation est décrit dans la **Figure 9**. 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**)[33, 34].

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**)[33].



1- dispersion du pa
dans la solution du
polymère

2- formation du
coacervat ou
séparation de phase

3- dépôt du coacervat

4- renforcement
del'enveloppe

Figure 9 Principe de l'encapsulation par coacervation.

➤ **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 10**

La solidification des microsphères est ensuite réalisée par ajout à basse température d'une phase dispersante appropriée. Les sphères sont filtrées, séchées et tamisées [35 ;36].

Les limites de cette méthode sont qu'on ne peut l'appliquer qu'aux principes actifs thermostables et aux matériaux lipidiques.

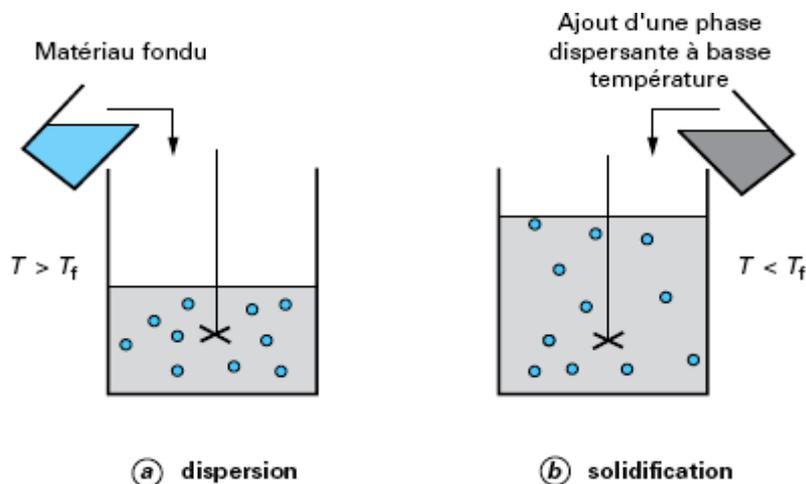


Figure10: Préparation des microsphères par fusion à chaud

➤ **Technique par évaporation ou extraction du solvant organique :**

Cette technique consiste à préparer une émulsion (simple ou double) puis à éliminer le solvant organique par évaporation. Lors de cette élimination, le polymère précipite, ce qui

conduit à la formation de sphère ou particule. Dans un premier temps, le polymère choisi pour constituer les microparticules est dissous dans un solvant organique non miscible à l'eau. Il faut donc choisir le solvant organique en fonction de sa miscibilité avec l'eau et de sa volatilité. Il est préférable qu'il ait un point d'ébullition assez basse et une tension de vapeur élevée (dichlorométhane, chloroforme, ou acétate d'éthyle) [37-40].

Ce mélange est ensuite émulsifié dans une phase aqueuse contenant un stabilisant (polyalcool vinylique PVA) pour former une émulsion H/E stable. Le solvant organique est alors évaporé par élévation de la température ou sous pression réduite, ou simplement par agitation à température réduite. Cette méthode permet l'encapsulation des principes actifs hydrophobes par simple ajout du composé dans la solution de polymère. Après évaporation du solvant organique, le médicament encapsulé se trouve au sein de la matrice polymère [41-46].

Dans le cas d'un principe actif hydrophile, celui-ci doit au préalable être dispersé sous forme de solution aqueuse dans la phase organique contenant le polymère. Cette émulsion est -elle-même dispersée dans une phase aqueuse externe pour constituer une émulsion double E/H/E [46].

Après évaporation du solvant organique, il se forme des microsphères ou des microparticules contenant le principe actif hydrosoluble.

Enfin, des microparticules doivent être purifiées pour éliminer le solvant résiduel potentiellement toxique, toutes ces raisons limitent l'application de cette technique à la production industrielle [47].

Le principe de ce procédé est représenté sur la **Figure 11**.

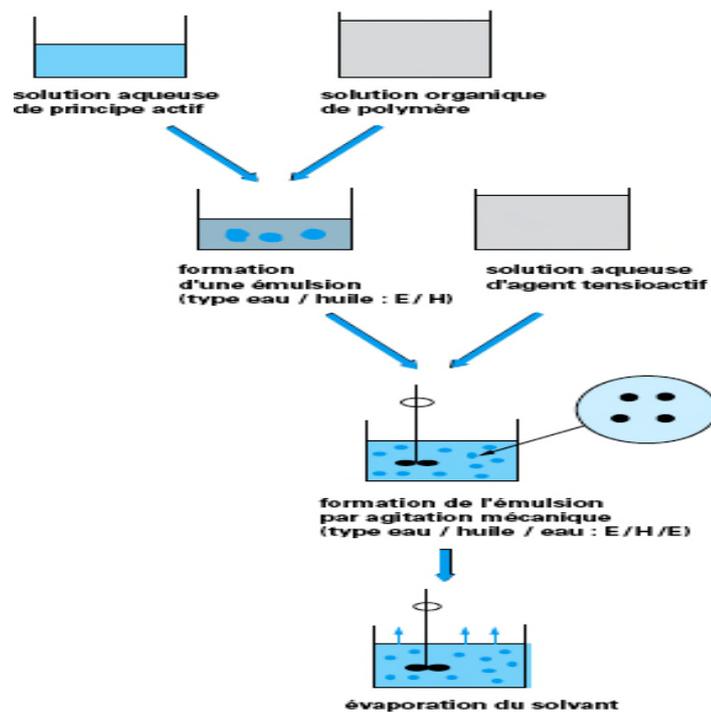


Figure 11: Procédé de microencapsulation par évaporation de solvant à partir d'une émulsion E/H [35].

II.4.2.b) Procédés mécaniques :

- **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 [48, 49].

- **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 particuliers 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 12

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 [35].

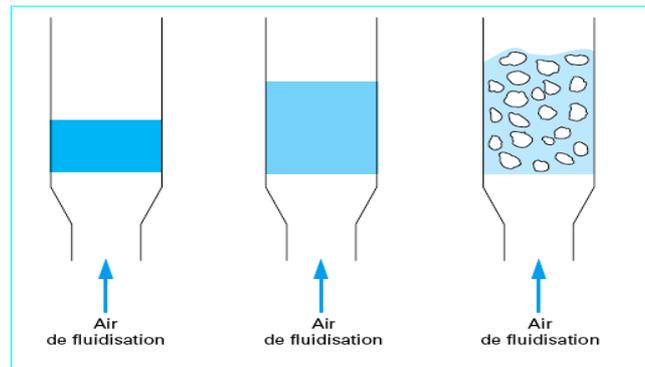


Figure 12 : Différentes étapes de la fluidisation [33].

II.4.2.c) Procédés chimiques :

Il existe plusieurs techniques dans cette catégorie telle que la polymérisation à l'interface et la polymérisation interfaciale. La caractéristique de cette dernière 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 [50].

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 13**[38,51].

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 [38].

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) [35]. 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).

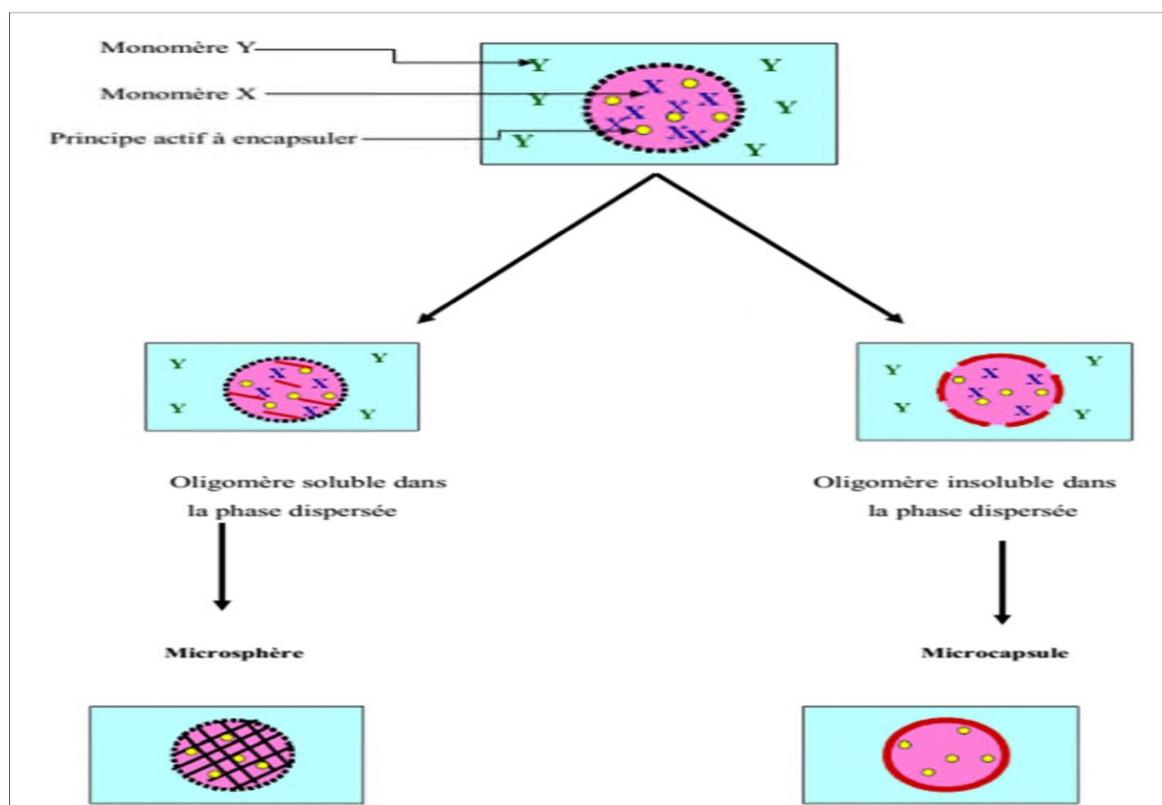


Figure 13 : Mécanisme de formation des microparticules par polymérisation interfaciale

II. 5. Techniques de caractérisation des microcapsules

II. 5.a. Mesures de taille : Il s'agit de diamètre moyen et dispersion de taille :

- Diffraction Laser (à sec ou en solution) : de 1 μm à plusieurs millimètres ;
- Diffusion dynamique de la lumière / potentiel zêta : de 1 nm à 10 μm [52].

II. 5.b. Microscopie : Il s'agit des observations structurales et de surface à savoir :

- Microscopie Electronique à Balayage (MEB) : observations de surface ;
- Binoculaire, microscopie optique, fluorescence [52].

II. 5.c. Propriétés thermiques et mécaniques : Il s'agit des analyses suivantes :

- Analyse mécanique dynamique (DMA) : Propriétés élastiques, force de rupture, libération induite par la pression (ex. écrasement) ;
- Calorimétrie différentielle à balayage (DSC) : Profils de libération induite par la température [52].

II.5.d. Analyses Microbiologie (bactéries, levures, moisissures) : Culture des microorganismes (immobilisés ou en suspension)

- Concentration cellulaire, viabilité et taux de survie : au procédé d'encapsulation, en conditions spécifiques (e.g. milieu gastrique simulé)
- Etudes de stabilité (températures et humidités contrôlées) [52].

II. 5.e. Quantification : Il s'agit du dosage, des profils de libération et d'autres analyses ; à savoir :

- ✓ Chromatographie / Spectrométrie ;
- ✓ Spectroscopies, RMN ;
- ✓ Conductivité, pH [52].

II. 6. Application de la microencapsulation :

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

Chapitre I

enveloppants, comme par exemple des polymères biocompatibles pour le domaine médical [53].

On trouve désormais des applications de la microencapsulation dans de nombreux domaines industriels

Tableau 1: Application de la microencapsulation dans l'industrie [31,54-56].

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

Partie III: L'activité Antioxydants et antibiotique

III. 1. Radicaux libres :

III. 1. 1. Définition :

Un radical est une molécule ou un fragment moléculaire qui contient un électron (ou plus) non apparié. De par sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner sa stabilité. Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de radicaux libres. Les sources des radicaux libres sont nombreuses[57].

III. 1. 2. Origine des radicaux libres :

Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques (**Figure III-1**) afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose.

Toutefois, au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production d'anions superoxydes se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome.

Les rayonnements UV sont capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres.

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes, également des antibiotiques, des anticancéreux L'infection au VIH a pour effet d'accroître la production de radicaux libres dans l'organisme [58].

III. 1. 3. Nature des radicaux libres :

III. 1.3.a) Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)

L'oxygène doit sa grande réactivité à sa structure particulière. En effet, il possède deux électrons célibataires non appariés sur sa couche orbitale externe. Cette molécule est essentielle au bon Fonctionnement de l'organisme[58].

❖ L'ion superoxyde O_2^- :

L'ion super oxyde O_2^- est un dérivé très réactif de l'oxygène, relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme, mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives[58].

❖ Radical libre hydroxyle (OH \cdot) :

Le radical libre hydroxyle OH \cdot est très réactif. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'ion super oxyde[57].

❖ Oxygène singulet 1O_2

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :



III. 1.3.b). Espèces libres non oxygénées :

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène.

Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs. Nous citerons, par

Exemple :

Les acides gras peroxydés, résultats de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques.

Les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ERO générant des molécules réactives et nocives[57].

III. 2. Antioxydants :

III. 2. 1. Définition :

Les antioxydants sont des composés chimiques capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit

En outre, l'antioxydant alimentaire idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose, et non toxique, n'entraîne ni coloration, ni d'odeur, ni saveur indésirable, résistant aux processus technologiques, il est stable dans le produit fini[59].

III. 2. 2. Mécanisme d'action :

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol.

En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire.

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur[59].

III. 2. 3. Utilisation des antioxydants :

Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation.

Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras.

Dans l'industrie teinturerie : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lors de la teinture[57].

III. 2. 4. Classification des antioxydants :

Les antioxygènes sont classés dans trois catégories différentes [57]:

Les antioxydants synthétiques.

Les substances synergiques.

Les antioxydants d'origine végétale.

III. 2.4.a) Antioxydants synthétiques:

Parmi les antioxydants phénoliques de synthèse qui sont autorisés dans certains aliments : le BHT 321 (3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène), BHA 320 (3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole), sont l'un et l'autre soluble dans les lipides et résistent bien à la chaleur. Ils ont une action synergique, ils présentent l'inconvénient d'avoir une odeur désagréable et s'évapore rapidement. Le TBHQ (tertiobutyl-hydroxyquinone) est moins soluble dans les graisses et le PG (gallate de propyle) à l'avantage d'être relativement soluble dans l'eau, mais l'inconvénient d'être peu soluble dans les lipides, peu résistant à la chaleur et de donner avec le fer des sels de couleur foncée. Le nitrite présente des propriétés anti oxydantes, il peut aussi former des nitrosamines cancérigènes. Les chélateurs de métaux utilisés et plus efficaces sont les polyphosphates et les dérivés d'acide citrique[59].

III. 2. 4.b) Substances synergiques :

Ce sont des molécules qui améliorent l'action de certains antioxydants. Ce qui se traduit souvent par un accroissement de la période de protection, parmi eux se trouvent : Les acides lactique, tartrique et ortho phosphorique et leurs sels de sodium, potassium ou calcium. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer ou le cuivre, dont on connaît bien l'effet pro-oxydant à faible dose. Cependant, ce n'est peut-être pas la seule explication, car plusieurs de ces produits sont d'assez mauvais chélatants[57].

III. 2. 4. C) Antioxydant d'origine végétale :

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants. Les antioxydants naturels dont l'efficacité est la plus reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine sont : les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols[57].

- ❖ **Tocophérols** : La grande stabilité des huiles végétales, dans les conditions d'oxydation, est due à la présence d'un taux élevé d'antioxydants naturels dont les plus importants sont les tocophérols qui se présentent sous quatre formes isométriques : α , β , δ et γ . Les tocophérols protègent contre l'oxydation naturelle des acides gras, en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI). On a signalé qu'une molécule de tocophérol peut protéger 103 à 106 molécules d'AGPI[57].

Exemple de tocophérol : La vitamine E : La vitamine E est un antioxydant majeur liposoluble. C'est un composé amphiphile, capable de s'insérer dans les membranes cellulaires : globules rouges, cellules endothéliales, cellules musculaires, neurones (c'est le seul antioxydant du système nerveux central).

Il existe dans la nature plusieurs dérivés de la vitamine E à activités différentes (α -, β -, γ -, δ - tocophérol, tocotriénols, ...). Ils sont différenciés par les substituants du noyau chromanol (noyau benzyle associé à un hétérocycle à six carbones substitués par un hydroxyle et par une chaîne latérale ramifiée saturée s'il s'agit de tocophérol ou insaturée s'il s'agit de tocotriénols).

Caroténoïdes : Les caroténoïdes sont, avec la chlorophylle et les anthocyanes, les pigments les plus répandus dans la nature. A ce jour, plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés, mais seule une quarantaine est retrouvée régulièrement dans l'alimentation humaine. Une trentaine de caroténoïdes et de leurs métabolites a été identifiée dans le plasma et les tissus humains, mais 6 caroténoïdes sont majoritaires : le β -carotène, le lycopène, la lutéine, la β -cryptoxanthine, l' α -Carotène, et la zéaxanthine.

Le plus important et le plus connu des caroténoïdes est le β -carotène. Il a longtemps été étudié pour son activité de provitamine A. Cependant, tous les caroténoïdes ne peuvent pas être convertis en vitamine A. Ils intéressent de plus en plus les chercheurs pour leur pouvoir antioxydant que n'a pas la vitamine A.

Les caroténoïdes peuvent agir en tant qu'antioxydants selon plusieurs mécanismes



III. 2.5. Evaluation de la capacité antioxydante par des tests in vitro :

Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par deux mécanismes : par transfert d'électron singulet ou par transfert d'atome d'hydrogène. Les méthodes ABTS. + Decolorization Assay (ou TEAC) et DPPH jouent sur le transfert l'électron singulet, alors que la méthode ORAC joue sur le transfert d'un atome d'hydrogène.

Les méthodes ABTS et DPPH sont couramment utilisés pour analyser les extraits de plantes et de fruits. La méthode ORAC est plus récente et est applicable sur quasiment toutes les matrices (extraits végétaux, aliments, plasma sanguin, ...).

III. 2. 5.1. Test TEAC (ou ABTS):

Trolox Equivalent Antioxydant Capacity ou test ABTS° + Decolorization Assay. Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS° + de coloration bleu-verte en le transformant en ABTS+ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxyda[60].

III. 2. 5.2. Test ORAC:

Oxygen Radical Absorbance Capacity. La méthode est basée sur la décroissance de la fluorescence de la fluoescéine en présence d'un oxydant chimique l'AAPH (un radical peroxy libre stable). Le produit à tester peut être capable de protéger la fluoescéine et réduire la vitesse de dégradation de la fluorescence. Il possède alors un pouvoir antioxydant[60].

III. 2. 5.3. Test DPPH :

Cette méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH°. La réduction de ce radical par un donneur d'atome H venant de l'antioxydant à tester AH conduit à la formation de la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine incolore DPPH-H et au radical A



III. 3. L'activité antibiotique :

III. 3.1. 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[61], antivirale[62,63].

III. 3.2. 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.

III. 3.3. 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.

III. 3.3.1. 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.

III. 3.3.2. 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 [60, 61] 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).

III. 3.4. 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 [64,65].

Selon la nature du contact avec le germe : diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsionnant [66,67].

III. 3.4.1. 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.

III. 3.4. 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[68]. Il s'agit d'une méthode de diffusion en milieu gélosé coulé et solidifié en boîte de Pétri.

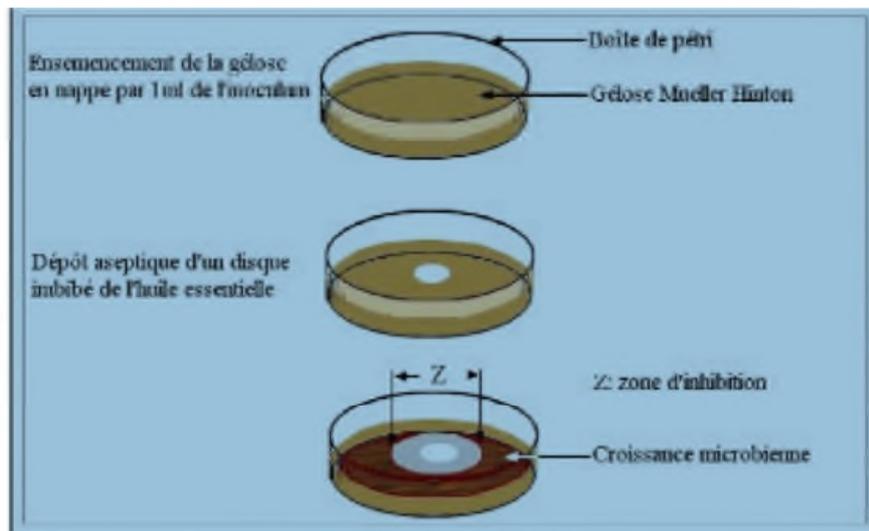


Figure 14. Illustration de la méthode de diffusion sur boîte Pétri (ZAIKI, 1988)

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 uniformément ensemencée 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[69].

Une variation de cette technique a été rapportée par Tharib et al.[70], 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. [71], Lis- Balchin et al. [72], Burt et Reinders[73], Faleiro et al.[74], Kunle et al[75]).

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

Chapitre II:

Etude expérimentale

Dans cette partie on va présenter :

- ✓ La préparation des microsphères à base d'un polymère biodégradable PCL.
- ✓ Les caractérisations des microsphères par différentes méthodes d'analyses.
- ✓ L'étude cinétique de la libération de principe actif.

I. 1. Synthèse des microsphères :

I. 1.1. Identification des produits:

1. Poly- ϵ -caprolactone (PCL) : C'est un polyester aliphatique synthétique, hydrophobe et biodégradable, utilisé pour l'ingénierie tissulaire, biomédical, alimentaire et d'autres applications industrielles. Ce polymère a été largement utilisé dans de nombreuses applications biomédical talque la conception de systèmes de médicaments à libération prolongée, en raison de leur lente dégradation.

Tableau2: propriétés physico-chimiques et mécaniques de la PCL [1.2]

Propriétés	PCL
Masse moléculaire	20 000 jusqu'à 100 000(g/mol)
Masse volumique	1.11(g/mol)
Degré de polymérisation	500
T _g (°C)	-55,-60
Tf(°C)	55-65
Td (°C)	300-350
Cristallinité (%)	67-68
Module d'Yong	190(MPa)
Resistance à la rupture	26-42(MPa)
Allongement à la rupture	800-1100 (%)
Solubilité	Soluble dans le chloroforme, le dichlorométhane, tétrachlorure de carbone, toluène, cyclohexanone et 2-nitropropane. Peu soluble dans l'acétone, 2-butanone, acétate d'éthyle, et insoluble dans les alcools, les huiles, et l'éther d'éthyle

2. **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.

Tableau 3: Propriétés physico-chimiques et mécaniques de la gélatine

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

3. **L'érythromycine :** L'érythromycine est produite par une souche de Streptomyceserythreus 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

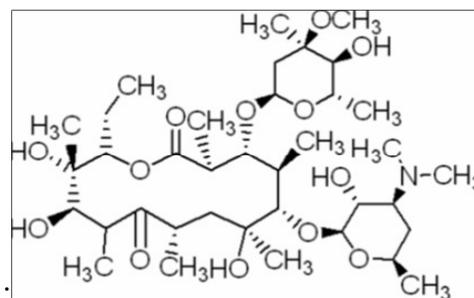


Figure 15 : La structure chimique de l'érythromycine

Tableau.4 : Propriétés physiques et chimiques d'ER.

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

3.a)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.

3.b) Études pharmacocinétiques :

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.

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-méthylérythromycine disponible dans le corps peut expliquer son absence à l'urine. [3]

4. Quercétine : La quercitrine ou quercétol est un flavonoïde de type flavonol présent chez les plantes comme métabolite secondaire. Le quercétol est le plus actif des flavonoïdes et de nombreuses plantes médicinales doivent leur efficacité à leur fort taux en quercétol. Les études *in vitro* et *in vivo* ont montré que c'était un excellent antioxydant[4]. La structure chimique de Quercétine :

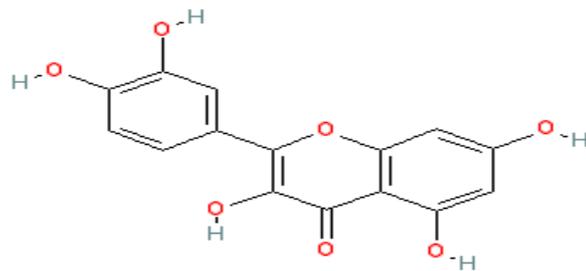


Figure 16 :La structure chimique deQuercétine.

Tableau5 : Propriétés physiques et chimiques de quercitrine. [5]

Formule brute	$C_{15}H_{10}O_7$
Masse molaire	$302,2357 \pm 0,0148$ g/mol
Solubilité	$60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-13}$
Masse volumique	$1,799 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$
T° fusion	$316 \text{ }^\circ\text{C}^3$
Solubilité	Très soluble dans l'éther, le méthanol; soluble dans l'éthanol, l'acétone, la pyridine, l'acide acétique

4.a)Études pharmacocinétiques ;

- Sources alimentaires :

La quercétine est largement disponible et facile à extraire, à isoler et détecter. Habituellement trouvé dans les légumes et les fruits la forme d'un glycoside, une quercétine est dans tous les sens un polyphénol.

Flavonols de type quercétine (principalement sous forme de quercétine glycosides), la plus abondante des molécules flavonoïdes, sont largement distribués dans le règne végétal. Elles sont trouvées dans une variété d'aliments, y compris les pommes, les baies, Brassica, câpres, raisins, oignons, échalotes, thé, et des tomates, ainsi que de nombreuses graines, noix, fleurs, écorces, et laisse.

- Métabolisme :

Une fois que la quercitrine est absorbée dans le tractus gastro-intestinal, est traitée par des enzymes de Phase II dans les cellules épithéliales de l'estomac et les intestins. Les métabolites combinés sont puis traités plus loin dans le foie et les reins.

La Structure de catéchol B-anneau subit méthylation à la 3 'ou4 'site hydroxyle par la catéchol-O-méthyl transférase (COMT) pour former Isorhamnetin et Tamarixetin, respectivement.

Les métabolites de la quercitrine semblent même s'accumuler dans les tissus peu après la consommation de légumes riches en quercitrine .Dans Des études in vitro ont montré que les métabolites de la quercétine, sont produites dans les entérocytes et le foie, fonctionnent comme antioxydants en augmentant la résistance de faible densité cholestérol des lipoprotéines (LDL) à l'oxydation. Des études cellulaires ont montré que la quercitrine peut générer à la fois antioxydant et pro-oxydant selon ses concentration. La quercétine est le plus puissant des flavonoïdes pour protéger le corps contre les espèces réactives de l'oxygène, produit pendant le métabolisme normal de l'oxygène ou sont induite par des dommages exogènes. La quercétine semble être leflavonoïdes les plus puissants pour protéger le corps contre espèces réactives de l'oxygène, produites pendant le normal métabolisme de l'oxygène ou sont induits par des dommages exogènes.

En raison de ses propriétés pro-oxydantes, la quercétine peut entraîner dans les dommages oxydatifs quand il réagit avec différents biomolécules, telles que les lipides, les protéines et l'ADN.

I. 1.2. Mode opératoire :

1,5 g de gélatine est dissous dans 100 mL d'eau distillée sous une forte agitation pendant quelques minutes. Cette solution représente la phase émulsionnante. En parallèle, la phase organique (dispersée) est préparée par dissolution de 1.5g de polymère (PCL) et(0,3g - 0.5g)de principe actif(quercitrine ou L'érythromycine) dans 50 mL de dichlorométhane (DCM) sous agitation.

La phase aqueuse est d'abord introduite dans l'agitateur mécanique (Heidolph RZR1) avec une de turbine de 4 pales (Figure 5). Puis on met en marche l'agitateur à une vitesse de (750-950) (retour par minute) et température de 30C°. La phase dispersée est ensuite ajoutée goutte à goutte. Après une durée de 3 heures30mn, le DCM est complètement évaporé.

Les microsphères sont alors récupérées par filtration et lavées avec l'eau distillé trois fois. Les microsphères obtenues sont ensuite observées sous microscope optique.



Figure 17: Dispositif expérimental de la synthèse des microsphères.

I. 2. Caractérisation des microsphères :

I. 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 :

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

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

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

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

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

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

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

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.

I.2.2.SpectroscopieInfrarouge :

La spectrométrie infrarouge est l'un des outils les plus utilisés pour la caractérisation et l'identification des molécules organiques. Est une méthode de caractérisation rapide et sensible de la plupart des molécules existantes.

➤ **Principe :**

La spectrométrie infrarouge est la mesure de la diminution de l'intensité du rayonnement qui traverse un échantillon en fonction de la fréquence de vibration de la liaison chimique dans une molécule. Le rayonnement infrarouge dispense suffisamment d'énergie pour stimuler les vibrations moléculaires à des niveaux d'énergie supérieurs. Elle est utilisée principalement pour l'analyse qualitative d'une molécule, en mettant en évidence la présence de liaisons entre les atomes (fonctions et groupements).

La majorité des applications se situe entre 2,5 et 25 μm soit en nombre d'ondes de 4000 cm^{-1} -1400 cm^{-1} (IR moyen).

Un spectre infrarouge est traditionnellement présenté en transmission (fraction de l'intensité transmise par rapport à l'intensité incidente) exprimée en pourcentage et l'axe des abscisses en fonction du nombre d'onde (inverse de la longueur d'onde), sur un axe dirigé vers la gauche. La loi de Beer-Lambert ($A = f[C]$) est vérifiée en infrarouge, ce qui fait d'elle aussi une méthode d'analyse quantitative.

I. 2.3. Par DRX : La Diffraction des Rayons X (DRX) est une technique de caractérisation des matériaux cristallisés, qu'ils soient massifs, sous forme de poudre ou de dépôts. En laboratoire, cette technique est principalement appliquée aux matériaux inorganiques : minéraux, métaux, alliages, céramiques.

➤ **Principe :**

Le principe est le suivant : les faisceaux de Rayons X produits par le tube sont envoyés sur l'échantillon dans lequel ils sont déviés par les atomes. Ces faisceaux diffractés interfèrent entre eux, conduisant à la production d'un signal intense dans certaines zones précises de l'espace. C'est ce signal qui est collecté par le détecteur, et tracé sous forme d'une courbe (diffractogramme) qui présente des pics à des angles bien spécifiques de diffraction. La position de ces pics est une véritable signature de l'arrangement des atomes à l'intérieur d'un cristal (distance entre atomes, entre plans intra cristallins). La relation empirique qui relie les angles auxquels sont observés les pics et les distances entre plans atomiques est la loi de Bragg.

La diffraction des rayons X permet de distinguer des produits ayant la même composition chimique mais dont les arrangements atomiques diffèrent. Par exemple, les carbonates de calcium comme la calcite et l'aragonite, de même formule chimique (CaCO_3), ont des diagrammes de diffraction différents. En revanche, les phases de nature chimique

différente mais dont les atomes sont organisés selon le même arrangement présentent de grandes similitudes, à savoir des pics de diffraction localisés aux mêmes positions angulaires.

I. 3. Etude cinétique :

I. 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 (50 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.

I. 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.

I. 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 :**

HCL: 0.1M 20mL, **borax:** 0.025M 500mL.

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.

I. 3.2.b) La détermination de la longueur d'onde maximal pour les deux pH par UV-Vis:

Afin de déterminer les valeurs de longueur d'onde, un spectre est réalisé dans les deux pH(1,2,7,4) où les spectres actifs du spectrophotomètre ont été atteints à la Faculté des Sciences de la Matière à l'Université Ibn-Khaldoun, Tiaret Les longueurs d'ondes sont exprimées en nm

Tableau 6: Les valeurs des λ_{\max} de l'érythromycine dans les différents milieu

	pH de milieu	λ_{\max} (nm)
Erythromycine	1.2	286
	7.4	268

Tableau 7: Les valeurs des λ_{\max} de Quercetin dans les différents milieux.

	pH de milieu	λ_{\max} (nm)
Quercetin	1.2	374
	7.4	386

I. 3.2.c) Etalonnage de principe actif:Une solution mère a été d'abord préparée de concentration donnée (10^{-2}). Ensuite, autres solutions de concentrations différentes ont été préparées par dilution les absorbances (A) correspondantes ou solution préparées ont été déterminées à l'aide du spectrophotomètre UV-Visible.

Le tracé de DO max = f (C) nous a permet d'avoir les courbes d'étalonnage correspondantes (figures17.18)

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

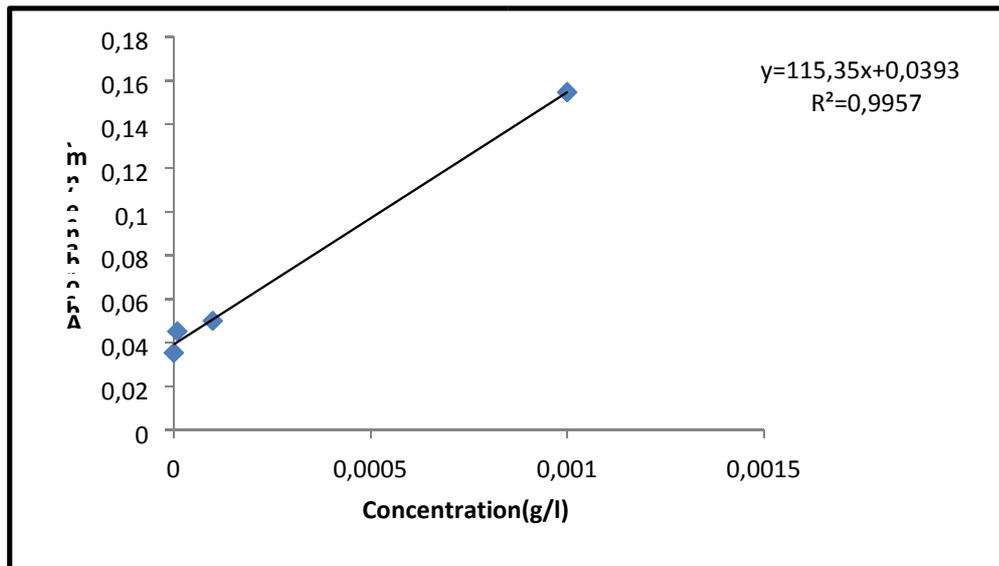


Figure 18. : Courbe d'étalonnage de l'érythromycine à pH=1.2 (286).

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

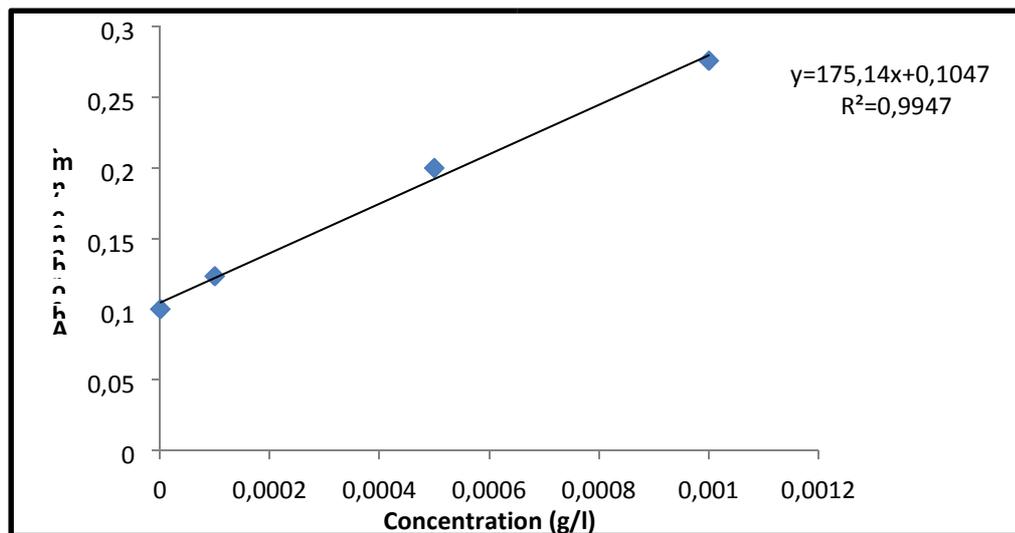


Figure 19: Courbe d'étalonnage de ER à pH=7.4 (268nm).

➤ **Courbe d'étalonnage de Quercetin à pH=1.2**

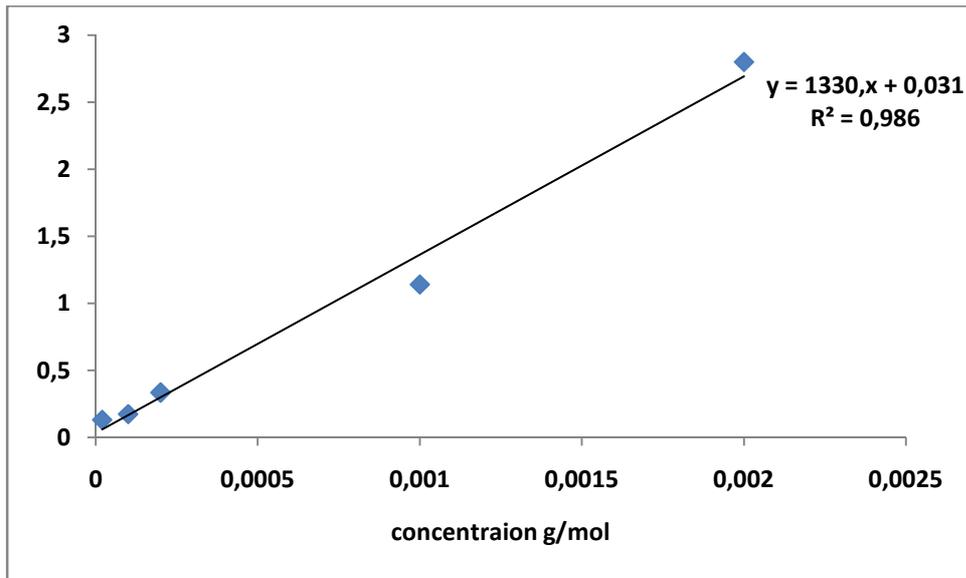


Figure 20 : Courbe d'étalonnage de QR à pH=1.2 (374nm)

➤ **Courbe d'étalonnage de la Quercetin à pH=7.4**

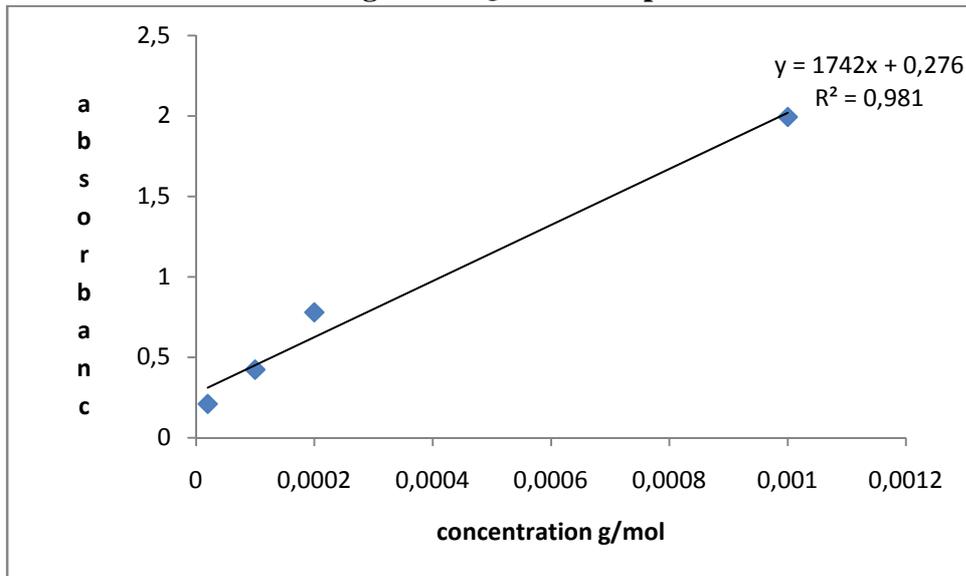


Figure 21: Courbe d'étalonnage de QR à pH=7.4 (386nm).

En traçons ces courbes d'étalonnage, on peut déterminer la valeur de ϵ_{\max} qui correspond à la valeur de la tangente de la droite $DO_{\max} = f(C)$.

Les valeurs des coefficients d'absorption spécifiques trouvées sont données dans le tableau 10:

Tableau 8 : Valeurs de λ_{\max} du ER à pH=1,2 et pH=7,4 à 37°C.

pH du milieu	1.2	7.4
ϵ (L. mol .cm)	115.3	175.1

Tableau 9 : Valeurs de λ_{\max} du QR pH=1,2 et pH=7,4 à 37°C

pH du milieu	1.2	7.4
ϵ (L. mol .cm)	1330.7	1742

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 (L. mol⁻¹.cm⁻¹).

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

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

I. 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 22: 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 :

$$m_t = D.O . V_d M_M / \varepsilon . V_f$$

D.O : Densité Optique lue à chaque prélèvement

ε : Coefficient d'extinction moléculaire =

V_d : Volume de dilution du prélèvement (10 cm³) ;

V_f : Volume du flacon (réacteur) (50 mL) se change au court du temps.

M_M : Masse Molaire du principe actif.

$$Pa\% = M_t / M_i . 100$$

I. 3.4. Résultats de la cinétique de libération:

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 5

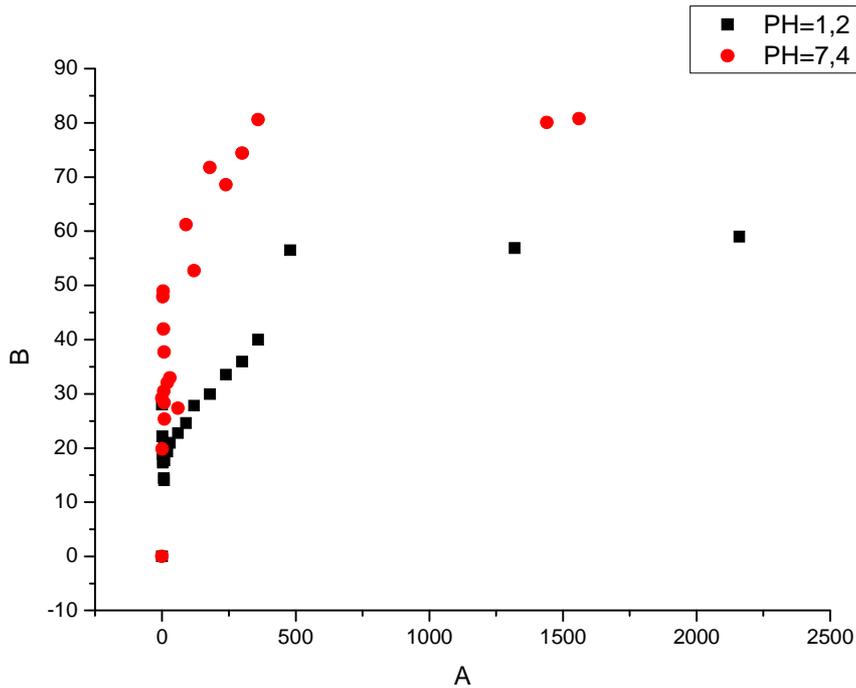


Figure 23: Le taux de libération de PA en fonction du temps.

Selon la figure, la libération de QR est préférée à pH 7,4 on note un taux de libération approchant les 81%, le même profile est observé dans le pH=1.2

Le taux de libération du PA augmente en fonction du temps puis il atteint un palier à 81%

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

I. 4. Microscopie électronique à balayage (MEB) :

La microscopie électronique à balayage a été employée pour déterminer la morphologie et la taille des microparticules. Ces derniers ont été analysés par MEB

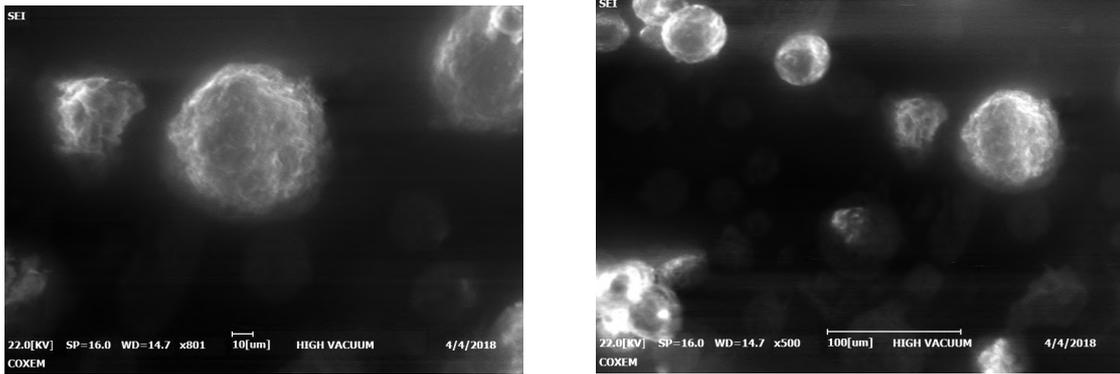


Figure 24: Photo MEB des Microsphères QR. A-forme sphérique,

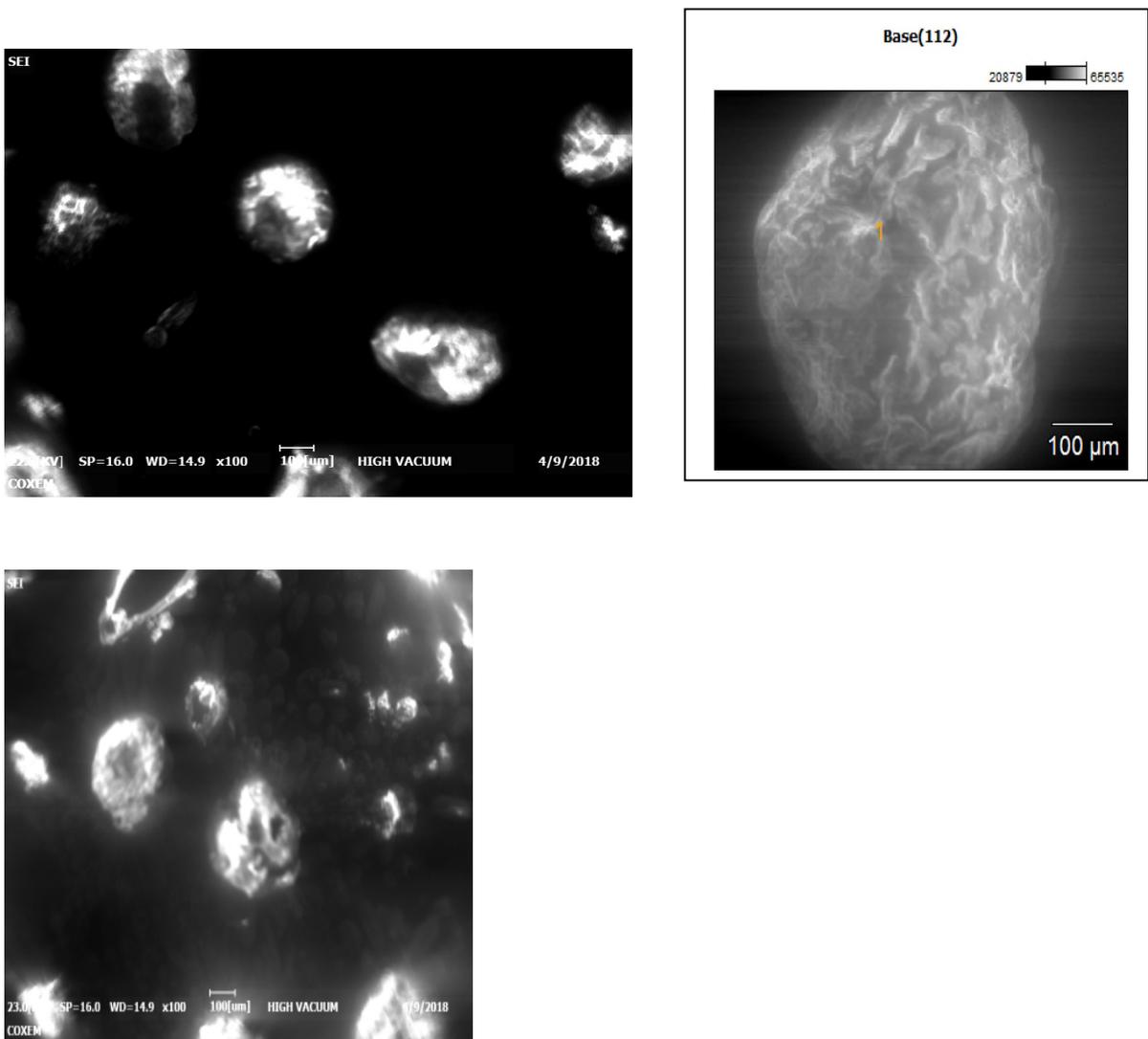


Figure 25: Photos de microsphères ER. prises par microscope à balayage électronique . - formes ovoïdes et irrégulières.

D'après les images MEB on remarque que les microsphère sont de forme sphérique et de forme ovales et présente une surface rougeuse.

I. 5. Résultats Caractérisation des microsphères :

I. 5. 1. Distribution de taille :

Les résultats des distributions sont donnés dans le tableaux10

Tableau 10 : Résultats granulométriques des microsphères .

	centre de classe di	effectif ni	ni*di	fréquence en nombre %	ni*di2	fréquence ne surface %	ni*di3	frequence en masee%	ni*di4
[0-3]	1,5	56	84	12,41685	126	0,795116	189	0,16779026	283,5
[3-6]	4,5	215	967,5	47,67184	4353,75	27,47409	19591,875	17,3932584	88163,4375
[6_9]	7,5	157	1177,5	34,81153	8831,25	55,72909	66234,375	58,8014981	496757,8125
[9-12]	10,5	23	241,5	5,099778	2535,75	16,0017	26625,375	23,6374532	279566,4375
Somme	24	451	2470,5	100	15846,75	100	112640,625	100	864771,1875

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.

Tableau 11 : Diamètres moyens (μm) des microsphères (1).

d10	d32	d43	Dispersion
5,477827051	6,4143898	7,677258427	1,401515301

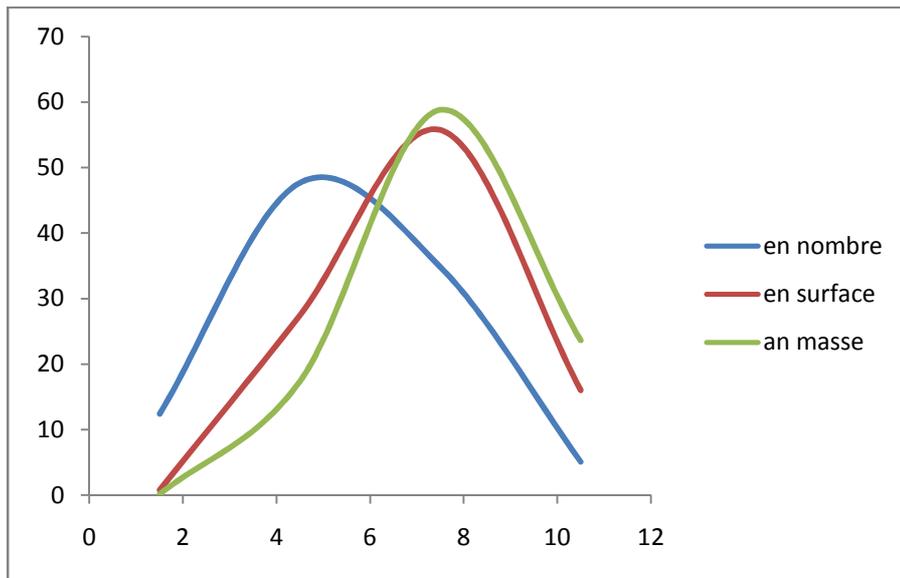
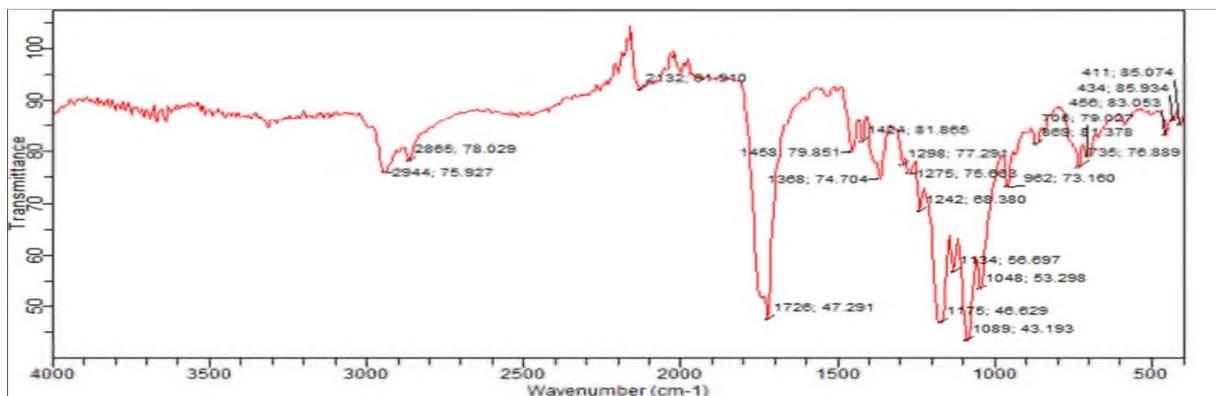


Figure 26 : La distribution en taille demicrosphèrePCL

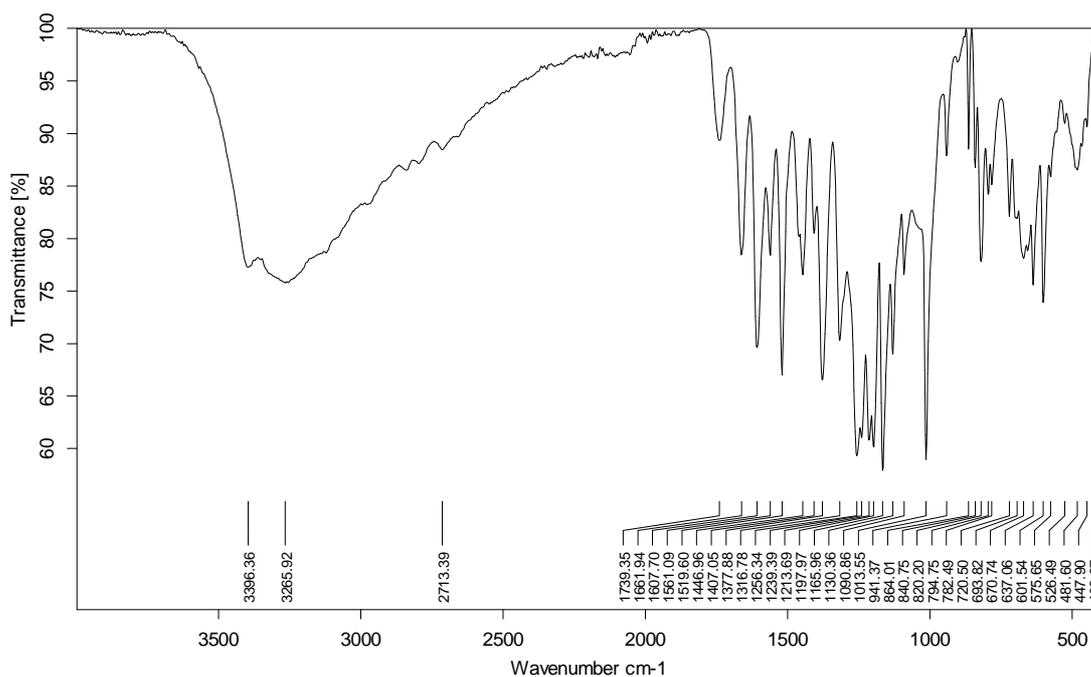
En vue de ces courbes, on peut déduire que le système est polydispersé

I. 5. 2. Spectrophotomètre infrarouge à transformé de Fourier



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

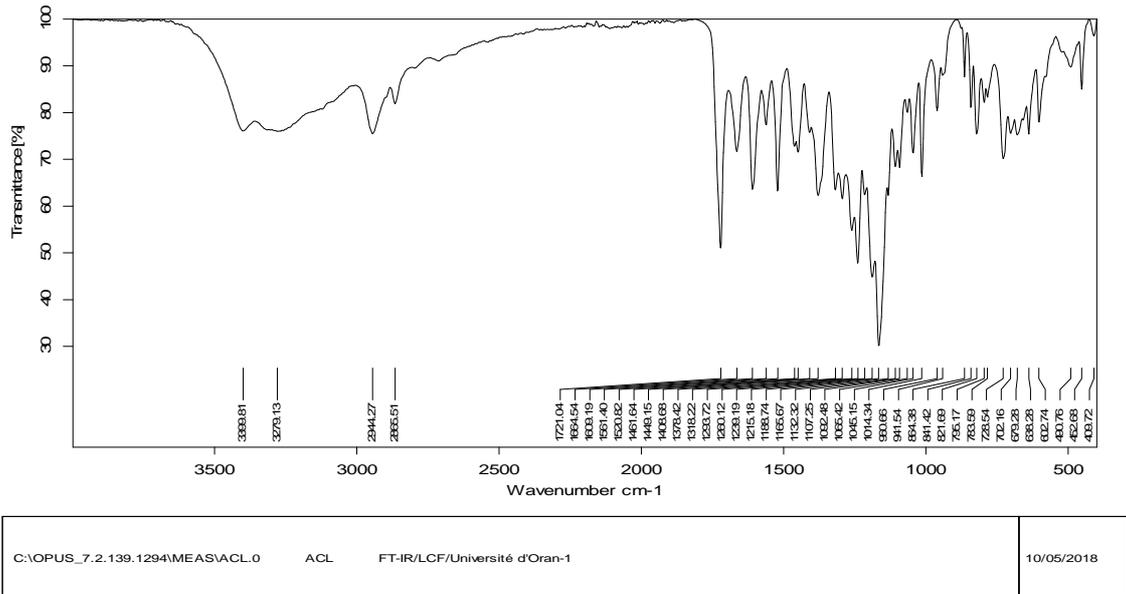
Figure.27 : Spectre Infrarouge de PCL.



C:\OPUS_7.2.139.1294\MEAS\quercitine.0	quercitine	FT-IR/LCF/Université d'Oran-1	10/05/2018
--	------------	-------------------------------	------------

Longueur d'onde	Fonction organique
3396.36-3265.92	O-H
1739	C=O
2713.39	C-H
1446-1607.70	C=C
1130.36	C-O-C

Figure.28 : Spectre Infrarouge de QR.



Longueur d'onde	Fonction organique
3399.81	O-H
1721.04	C=O
2865.51	C-H
1092.48-1378.42	C-O
1449-1609.19	C=C
1132.32	C-O-C

Figure.29 : Spectre Infrarouge de QR+PCL.

Le spectre IR des microparticules établit est comparé aux spectres du polymère matrice utilisé et de principe actif (QR). Les résultats montrent que le spectre des microsphères n'est que la somme des deux spectres FTIR de PCL et QR. Les principales bandes d'absorption d'QR qui apparaissent nettement dans le spectre des microsphères .

I. 5. 3. Diffraction des rayons X (DRX) :

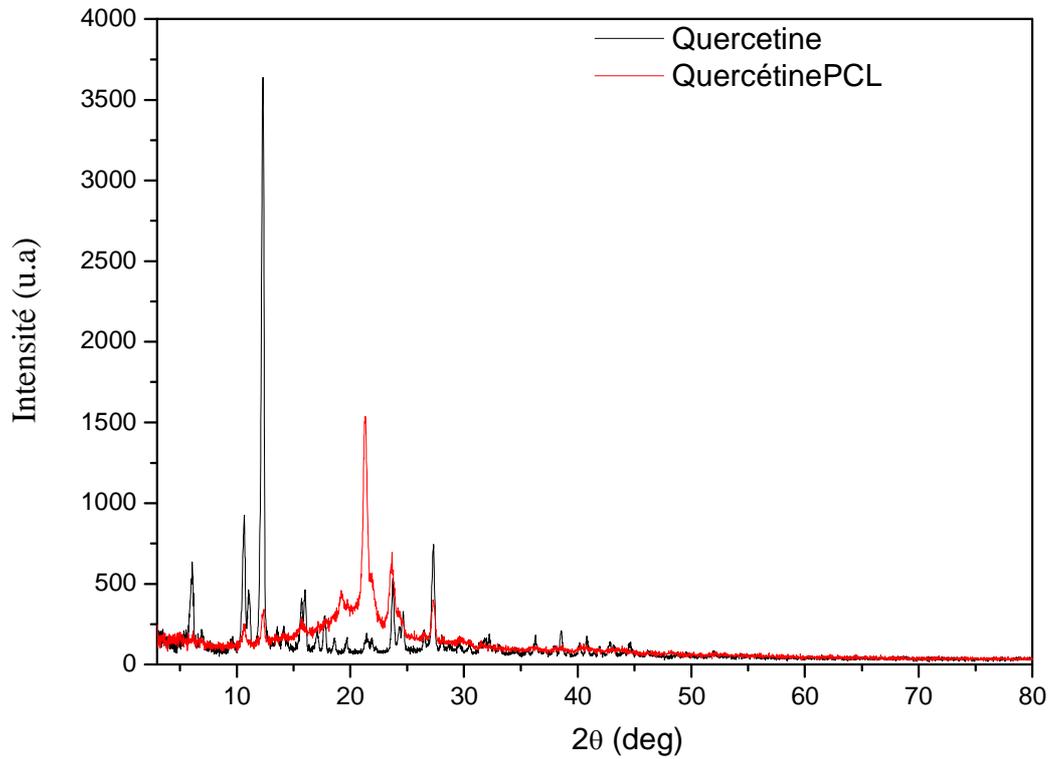


Figure30: Le diffractogramme microsphères(QR+PCL) est QR SEUL

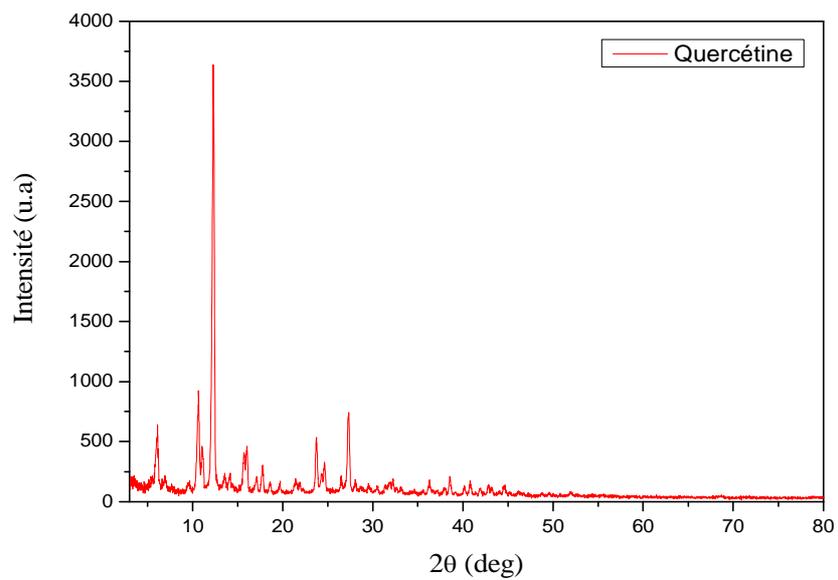
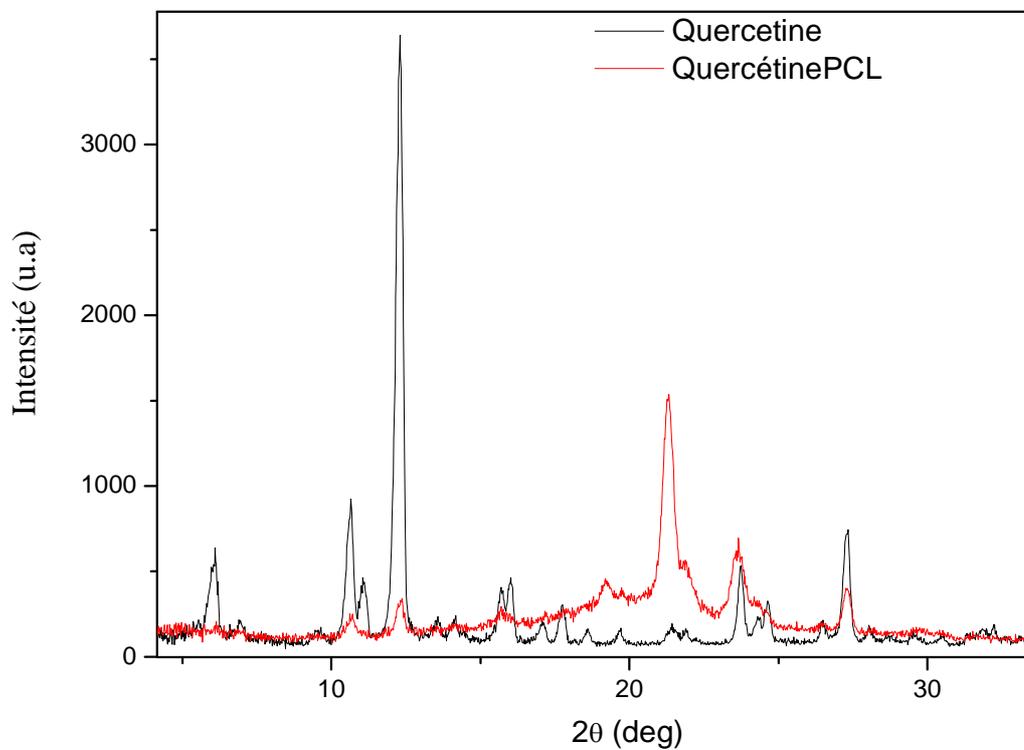


Figure31: Le diffractogramme QR .

Le difratogramme montre que la QR est roduit très cristallin en analysant ce résultat les pics très fin et l'absence des domaines amorphe étalés démontre l cristanilité de ce produit , En comparant avec celui des microsphères a bas de quercetin on note l'absence du pic le plus imporant pour la quercetine a 15°c ce qui prouve qu la quercetine se trouve encapsuler dans la partie amorphe du polymère et non la pie cristalline



Partie II : L'activité antioxydants et antibiotique

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

II. 1. L'activité antioxydants

II. 1.1. Introduction :

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (Favier, 2003). [6]

II. 1. 2.Évaluation de pouvoir antioxydant :

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante . La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans notre étude nous avons utilisé un test chimique qui est : l'effet des antioxydants sur le radical libre (2,2diphényl1-1-picrylhydrazyl)

(DPPH). [6]

II. 1.3. Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1- picrylhydrazyl) :

Le DPPH• (2,2-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH• est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (Parejo et al, 2002).[6]

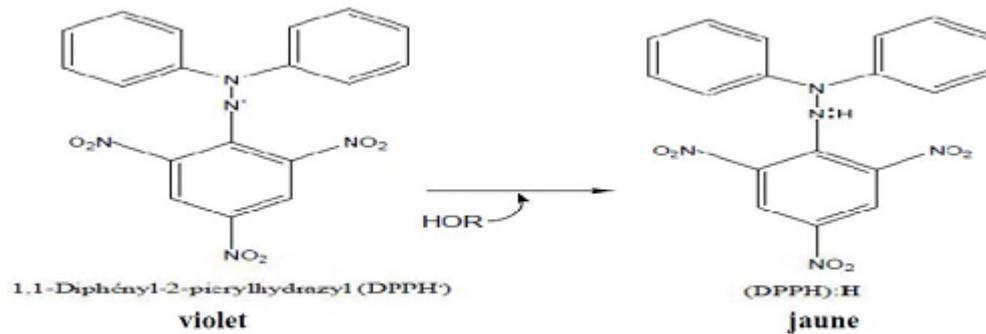


Figure32: Piégeage du radical libre DPPH[•]

II. 1.3.a) Calcul des pourcentages d'inhibitions :

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$I \% = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$$

I (%) : pouvoir d'inhibition en %.

A₀ : absorbance de la solution de DPPH en absence de l'extrait

A₁ : absorbance de la solution de DPPH en présence de l'extrait. [6]

II. 1.3.b) Calcule des IC₅₀:

IC₅₀ est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH , Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées et les standard[6]

II. 1.4.Mise en œuvre pratique

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH.

II. 1.4.1préparation de solution DPPH :

Afin de préparer la solution de méthanol DPPH on a dissous 0,0024 g DPPH dans 100 ml de méthanol laissé à température ambiante Pour 30 minutes avec agitation.

II. 1.4.2.mode de opératoire :

- 0.1g de microsphère a base de PCL/QR a été broyée dans 50ml de solution PH=7.4 ensuite 1ml de cette solution (PCL/QR)de concentration5.034ug/ml a été ajoutée a 1.9

ml DPPH et laisser reposer pendant deux heures à température ambiante et dans l'obscurité puis une absorbance a été mesurée à 517nm.

- On a testé l'activité antioxydante de la quercitrine seul.
- Le même protocole a été utilisé pour les prélèvements cinétiques

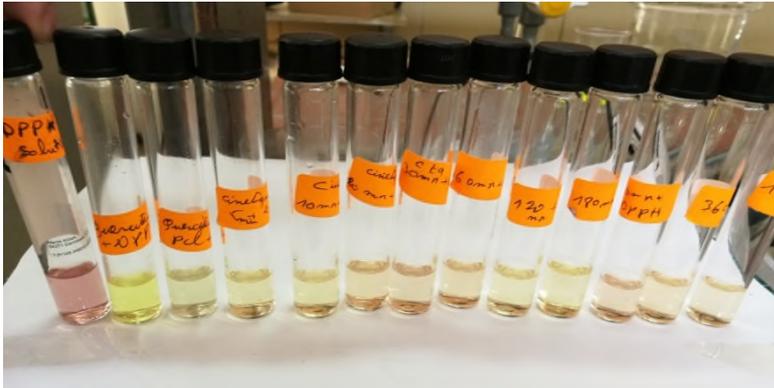


Figure33: Les résultats de la capacité d'inhibition de DPPH.

II. 1.5. L'étude du pouvoir antioxydant :

II. 1.5.1. Etude des prélèvements cinétiques en DPPH

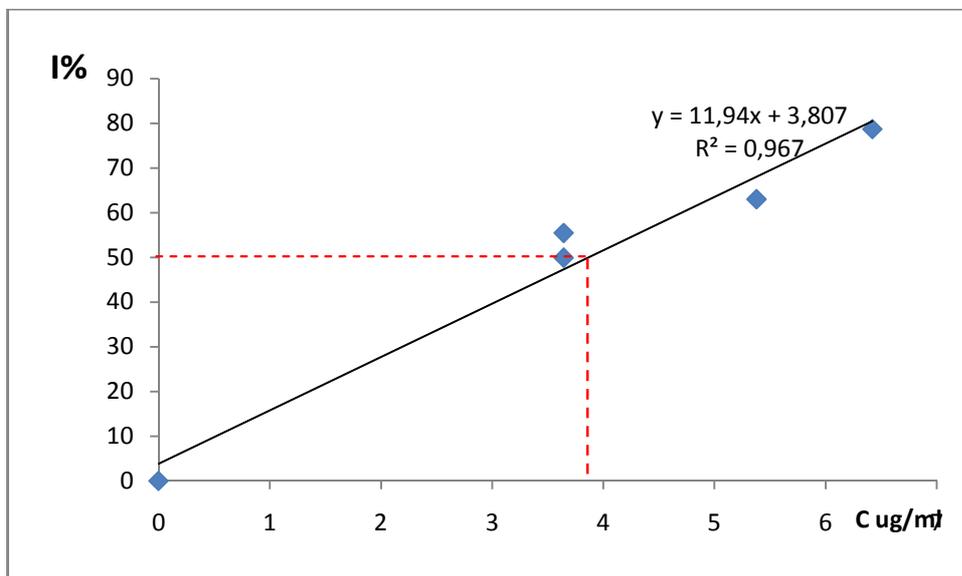


Figure34: La courbe représente le pouvoir d'inhibition des prélèvements cinétiques des QR pour radical DPPH.

PRODUIT	DO
Quercétine +PCIMicrosphère m=0.006	0.167
Quercétine m=0.006	0.143

Tableau 12 : évaluation de l'activité antioxydant par la méthode de DPPHde
QuercétineetQuercétine +PCI Microsphère



Figure35: évaluation de l'activité antioxydant par la méthode de DPPHdeQuercétine et
Quercétine +PCI Microsphère

La Quercétine encapsulée donne effet antioxydant avec une couleur jaune plus prononcée en comparant a la quercetine seule pou la même masse encapsulée (figure on remarque l'encapsulation est bonne méthode pour préserver l'activité antioxydant.

D' après les résultats obtenus dans la **figure35**l'activitéantioxydant a été relevée dans les prélèvements cinétiques de la libération de la querc dans le PH=7.4, la couleur de la solution des prélèvements a viré de la couleur violette a la couleur jaune ce qui veut dire que l'activité antioxydant du DPPHn' est pas inhibé par la PCL .

$$CI50\%=3.87$$

II. 2. L'activité antibiotique

II. 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.[7]

II. 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.

II.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.

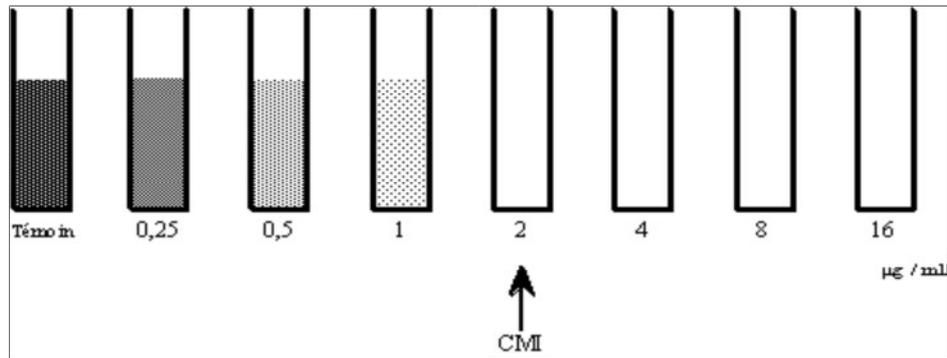


Figure 36 : Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide.

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 avoir ensemencé 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.

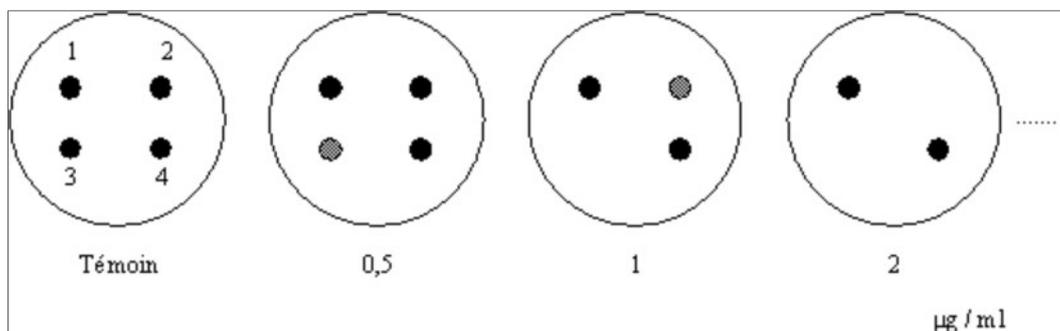


Figure 37 : Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé.

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 1µg/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.[8]

❖ 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.[9]

II. 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.[10]

II. 2.2.a) Procédure de diffusion en gélose :[11][12]

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.[12]

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 38**). 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.

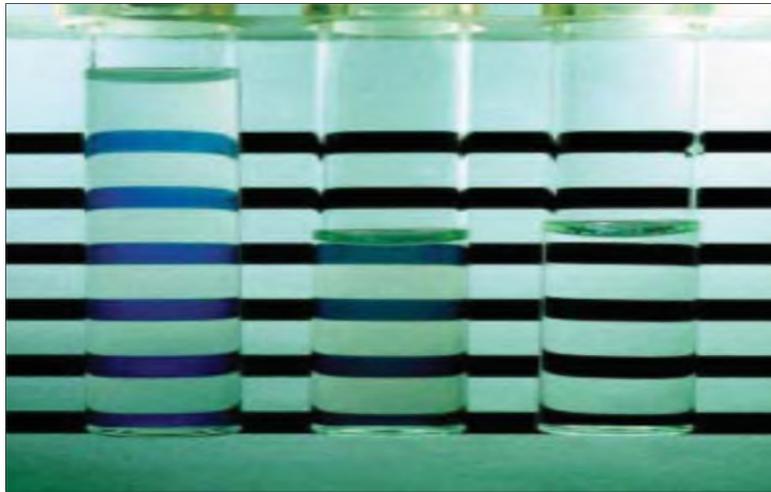


Figure38 : Comparaison de McFarland 0,5 avec la suspension de l'inoculum. De gauche à droite, les tubes sont le standard McFarland 0,5, E. Coli ATCC 25922 ajusté à la turbidité McFarland 0,5 et la solution saline non inoculée.

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.

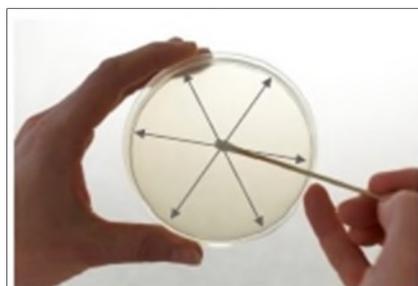


Figure39: Inoculation des boîtes de Petri

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.

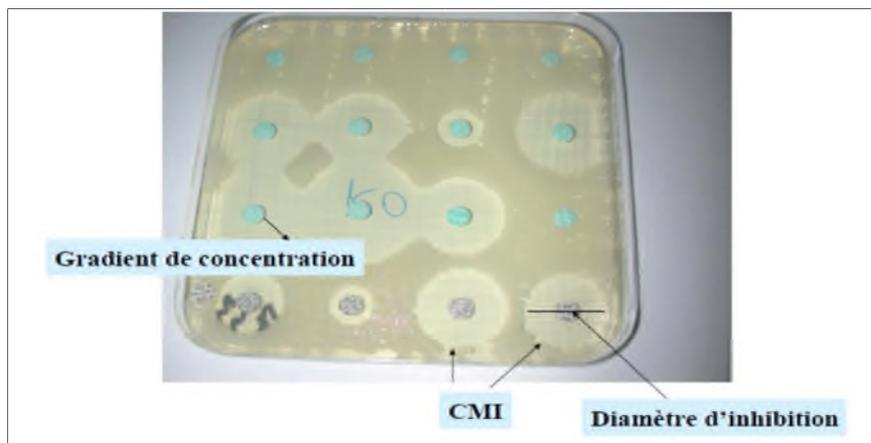


Figure 40 : Application des disques d'antibiotiques

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 41 : Lecture des zones d'inhibition.

II. 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.[9]

II. 3. Mode opératoire :

II. 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 $DO=0.096$ pour la souche de *Pseudomonas aeruginosa*, la même valeur pour $DO =0.098$ *Escherichia coli* et la souche *Staphylococcus aureus* leur $DO=$ ($\lambda=630nm$)

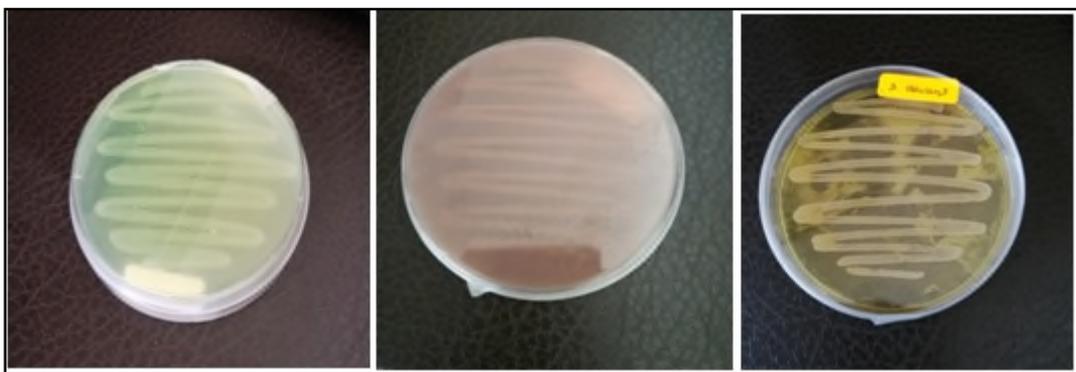


Figure 42: Les 3 souches bactériennes *Pseudomonas* ; *E. coli* et *S. aureus*

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

1ml du prélèvements de la cinétique de libération de l'érythromycine du pH7.4 sont placés dans des tubes stériles contenant 1000 μ L 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

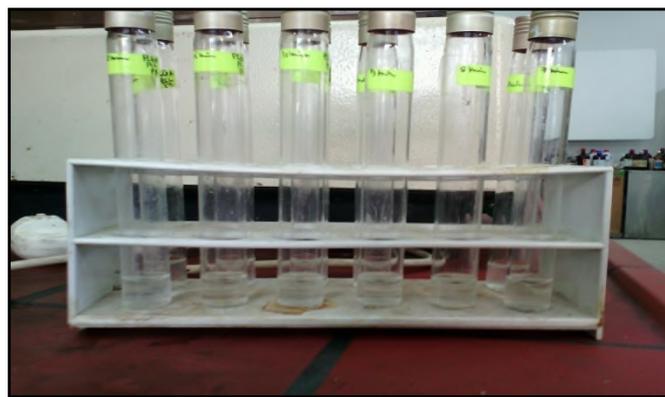


Figure 43 : La méthode de dilution en milieu liquide.

II. 3.3. La méthode de diffusion par disque :

La gélose de Mueller-Hinton a été préparée, autoclavée pendant 20mn à 130°C, ensuite écoulée dans des boîtes de Pétri. Après l'ensemencement, quatre disques stériles de 6

mm de diamètre sont déposés sur la gélose M.H, les disques imbibés avec 15 μ Ldu prélèvements 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 le prélèvement cinétique qui ont été incubés à 30°C pendant 48 heures. Après incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètres avec un pied à coulisse.

➤ Les diamètres obtenus sont donnés sous ce tableau :

Temps	D (mm)
0	0
60	1,6
90	1,4
120	1,5
300	1,5
1278	1,7

Tableau13: Les diamètres obtenus pour E-COLI en fonction du temps de la libération d'ER.

Temps	D (mm)
0	0
5	1,1
10	1,2
60	0,9
300	1,3

Tableau14: Les diamètres obtenus pour PSD en fonction du temps de la libération d'ER

Temps	D (mm)
0	0
10	1,3
60	0,6
90	0,5
120	0,8
300	1

Tableau15: Les diamètres obtenus pour STPen fonction du temps de la libération d'ER

➤ **Interprétation des tableaux :**

Tableau 1 :DO=1.7mm

D'après le tableau1 nous remarquons que le diamètre d'inhibition le plus impotent et celui du prélèvement 1278mn on peut dire que le souche E-COLI a été inhibé par l'érythromycine libre lors de la cinétique en comparant avec le diamètre d'inhibition du disque charge de ER seul.

Tableau2 : DOER=1.2

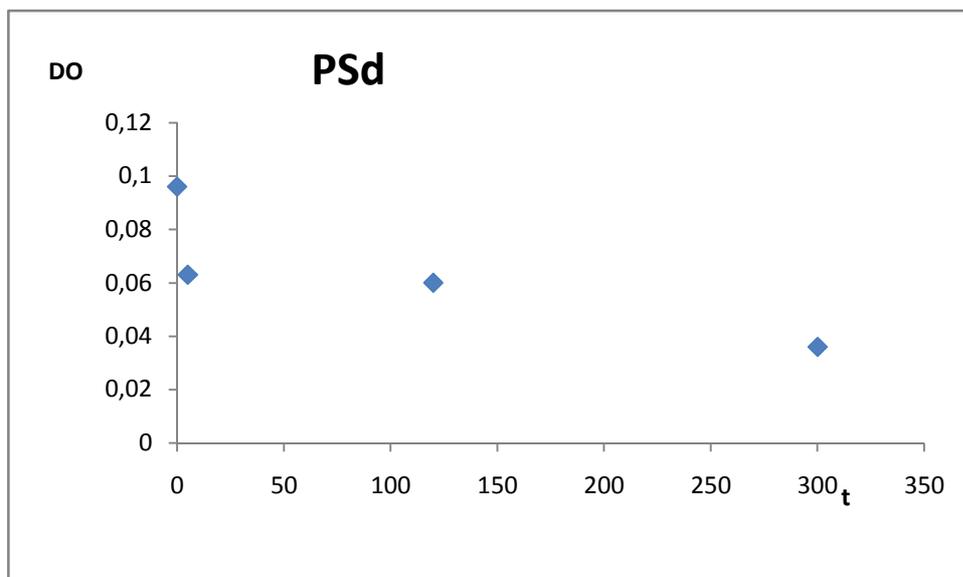
On remarque que diamètre d'inhibition augmente et l'inhibition le plus importante est pour le prélèvement t=300.

Tableau2 : DOER=1.2

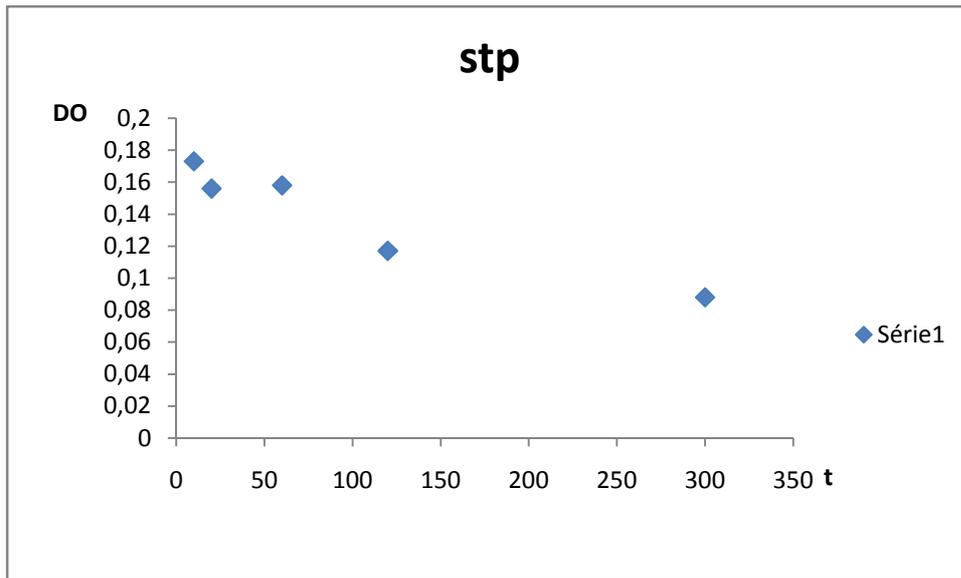
On remarque que diamètre d'inhibition le plus important est 1.3mm ce qui nous laisse a dire que la libration ER est rapide au début (effet brust).

On peut conclure que le prélèvement cinétique ont inhibes les souches testes avec des diamètres différents.

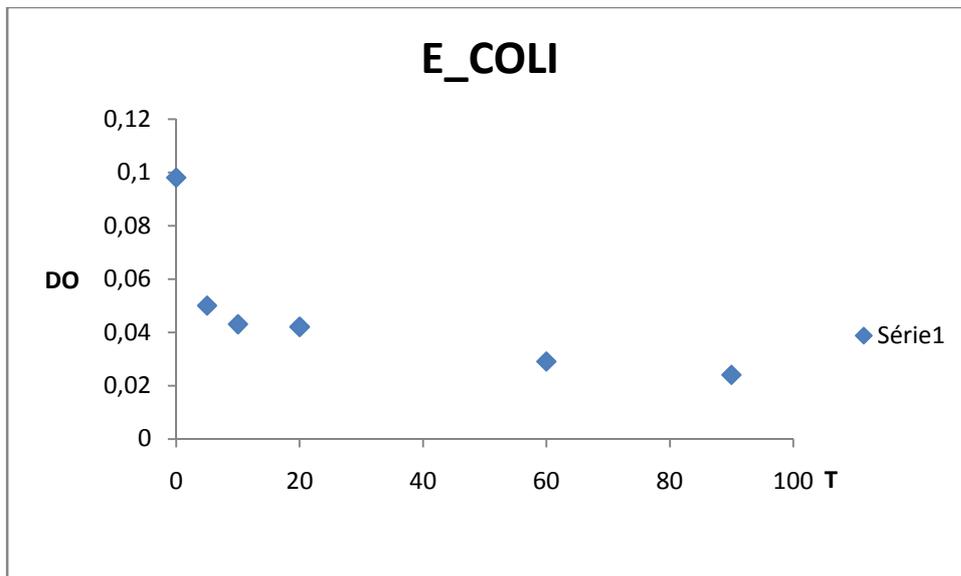
On a mesuré l'absorbance de croissance des souches utilisées pour les mêmesprélèvementscinétiques par dilution, on obtient les graphes suivant :



Figur44: Evolution des DO des souches Pseudomonas après 48h



Figur45: Evolution des DO des souches S après 48h



Figur46: Evolution des DO des souches après 48h.

L'absorbance de dilutions de prélèvements cinétiques a été par spectroscopie U.V a $\lambda=630\text{nm}$

On remarque que l'absorbance des trois souche a baisse le temps.

Ce qui rejoint les tableaux (1.2.3) le baisse d'absorbance signifie que le population bactérienne de volume.

III Résultats et disussion :

La libération du principe actif à partir de ces systèmes a été entreprise dans deux milieux de pH différents (1,2 et 7.4.). Les profiles de libération obtenus sont du meme profile

Les résultats montrent que la QUER se libère plus rapidement en milieu basique qu'en milieu acide dû probablement à sa solubilité et le taux de liquide absorbé simultanément.

Les microsphères obtenues ont été caractérisées par infrarouge et microscopie électronique à balayage. Ces systèmes sont polydispersés déterminé par microscopie optique.

La libération de laQUERC a été établie à 37°C dans un milieu acide de $\text{pH}=1,2$ et de basique de $\text{pH}=8,0$. Les microsphères obtenues sont alors capables de contrôler la libération de l'agent actif.

L'activité antioxydante réalisée montre la capacité à préserver l'activité de 'agent actif après le procédé d'encapsulation le I50 est de l'ordre de concentration 3.8 ug/ml ce qui correspond à 50% de DDPH réduit . l'évolution de l'absorbance prouve la libération contrôlée de la QUERC.

L'étude de l'activité antibiotique des microsphères par les prélèvements cinétiques monre l'activité antibiotique par rapport aux souches testés(Ecoli,Staph,Pseudo) ce qui montre une différence inhibition qui est importante pour Saph et la moins importante qui se manifeste des grandeurs de diamètre d'inhibition moins important par la méthode de diffusion des disques

Les tests en milieu liquides montrent une diminution de l'absorbance à partir de la valeur d'absorbance des suspensions bactériennes réalisées des trois souches ce qui rejoint le milieu solide Ce résultat démontre la libération progressive d'ERYT

Conclusion générale

Dans ce mémoire nous avons fait une synthèse bibliographique qui nous a permis de planifier notre plan de travail qui consiste préparer des formulations de microsphères à base de PCL et érythromycine ensuite de PCL est quercetine .

Une étude de libération de ces principes actifs a été menée nous a permis d'évaluer le pourcentage de principe actif dissous dans deux pH physiologiques reconstitués PH=7.4, PH=1.2.

Nous avons observé une bonne dissolution de l'antioxydant qui atteint 80% dans le PH=7.4, ce qui rejoint la littérature.

Ensuite pour confirmer cela on a fait une étude d'activité antioxydante avec le radical DPPH. les résultats obtenus nous ont permis d'évaluer I50.

Pour l'autre formulation PCL+ER l'étude de la l'activité antibiotique a révélé une activité inhibitrice différente vis à vis des souches testés E-coli Steph, pseudo .le souche le plus résistant été pseudonas le diamètre d'inhibition pour le milieu solide rejoint le milieu liquide.

En se référant aux résultats trouvés nous envisageons dans un avenir de pousser notre étude in vivo pour confirmer les résultats.

Les résultats obtenus des activités étudiées montre que l'encapsulation est a meilleure techniques pour préserver au maximum le caractère antioxydant ou antibiotique de principe actif.

Liste des figures

N° de la Figure	Légende	Page
Figure 1	Classification des polymères biodégradable	6
Figure 2	Les familles des polyesters biodégradables	7
Figure 3	schéma général d'une polymérisation par ouverture de cycle	10
Figure 4	Réaction de rétroscission	10
Figure 5	Réaction de redistribution	10
Figure 6	Mécanisme de la polymérisation cationique de l' ϵ -caprolactone proposé par Penczek	11
Figure 7	Mécanisme de polymérisation anionique par ouverture de cycle de l' ϵ -caprolactone	12
Figure 8	représentant la morphologie des microparticules	14
Figure 9	Principe de l'encapsulation par coacervation	16
Figure 10	Préparation des microsphères par fusion à chaud	16
Figure 11	Procédé de microencapsulation par évaporation de solvant à partir d'une émulsion E/H	18
Figure 12	Différentes étapes de la fluidisation	19
Figure 13	Mécanisme de formation des microparticules par polymérisation interfaciale	20
Figure 14	Illustration de la méthode de diffusion sur boîte Pétri (ZAIKI, 1988)	33
Figure 15	La structure chimique de l'érythromycine)	35
Figure 16	La structure chimique de Quercétine	40
Figure 17	Dispositif expérimental de la synthèse des microsphères.	46
Figure 18	Courbe d'étalonnage de l'érythromycine à pH=1.2 (286)	46
Figure 19	Courbe d'étalonnage de ER à pH=7.4 (268nm)	46

Liste des figures

Figure 20	Courbe d'étalonnage de QR à pH=1.2 (374nm)	47
Figure 21	Courbe d'étalonnage de QR à pH=7.4 (386nm)	47
Figure 22	le dispositif expérimental de la libération du PA.	49
Figure 23	Le taux de libération de PA en fonction du temps.	50
Figure 24	Photo MEB des Microsphères QR. A-forme sphérique,	51
Figure 25	Photos de microsphères ER. prises par microscope à balayage électronique . - formes ovoïdes et irrégulières.	51
Figure 26	La distribution en taille demicrosphèrePCL	54
Figure 27	Spectre Infrarouge de PCL	55
Figure 28	Spectre Infrarouge de QR.	55
Figure 29	. Spectre Infrarouge de QR+PCL	55
Figure 30	. Le diffractogramme microsphères (QR+PCL) est QR SEUL	57
Figure31	Le diffractogramme QR.	57
Figure 32	: Piégeage du radical libre DPPH [•]	60
Figure 33	Les résultats de la capacité d'inhibition de DPPH.	61
Figure 34	La courbe représente le pouvoir d'inhibition des prélèvements cinétiques.des QR pour radical DPPH	61
Figure 35	évaluation de l'activité antioxydant par la méthode de DPPHdeQuercétine et Quercétine +PCI Microsphère	62
Figure 36	Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide.	63
Figure 37	Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé	64
Figure 38	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	67
Figure 39	. InoculationdesboîtesdePetri.	67

Liste des figures

Figure 40	Application des disques d'antibiotiques	68
Figure 41	Lecture des zones d'inhibition	69
Figure 42	Les 3 souches bactériennes Pseudomonas ; E. coli et S. aureus	70
Figure 43	La méthode de dilution en milieu liquide	70
Figure 44	Evolution des DO des souches Pseudomonas après 48h.	72
Figure 45	Evolution des DO des souches S après 48h.	73
Figure 46	Evolution des DO des souches après 48h.	73

Liste des tableaux

Tableau1	Application de la microencapsulation dans l'industrie.	23
Tableau2	propriétés physico-chimiques et mécaniques de la PCL	34
Tableau 3	Propriétés physico-chimiques et mécaniques de la gélatine	35
Tableau 4	Propriétés physiques et chimiques de ER	36
Tableau 5	Propriétés physiques et chimiques de quercitrine	38
Tableau 6	Les valeurs des λ_{\max} de l'érythromycine dans les différents milieu	45
Tableau 7	Les valeurs des λ_{\max} de Quercetin dans les différents milieux	45
Tableau 8	Valeurs de ϵ_{\max} du ER à pH=1,2 et pH=7,4 à 37°C	48
Tableau 9	Valeurs de ϵ_{\max} du QR à pH=1,2 et pH=7,4 à 37°C	48
Tableau 10	Résultats granulométriques des microsphères	53
Tableau 11	Diamètres moyens (μm) des microsphères (1).	54
Tableau12	évaluation de l'activité antioxydant par la méthode de DPPH de Quercétine et Quercétine +PCL Microsphère	62
Tableau13	Les diamètres obtenus pour E-COLI en fonction du temps de la libération d'ER	71
Tableau14	Les diamètres obtenus pour PSD en fonction du temps de la libération d'ER	71
Tableau 15	Les diamètres obtenus pour STPen fonction du temps de la libération d'ER	71

Bibliographie

Chapitre I :

- [1] Imre, B. Pukánszky, *European Polymère Journal*, 49, 1215–1233, 2013.
- [2] M. Aminabhavi, R. H. Balundgi, P. E. Cassidy, *A Review on Biodegradable Plastics, Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 29(3), 235-262, 1990.
- [3] V. Siracusa, P. Rocculi, S. Romani, R. Macro Dolla, *Biodegradable polymer for food Trends in Food Science & Technology*, 19, 634-643, 2008.
- [4] Review, *J. Sci. Polymer Reviews*, 44(3), 231-274, 2004
- [5] Isabelle Vroman . Lan Tighzert, *Biodegradable Polymers, Materials*, 2, 307-344; doi: 10.3390/ma2020307, 2009..
- [6] M. Aminabhavi , R. H. Balundgi . P. E. Cassidy, *A Review on Biodegradable Plastics, Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 29:3, 235-262, 1990.
- [7] S.E. Ibim;K.E.Uhrich; S M.Attawia.; V.R .hastri, S.F El-Amin, Bronson, E.Preliminary in vivo report on the osteocompatibility of poly(anhydride-coimides) evaluated in a tibial model. *J. Biomed. Mater. Res.* 43, 374-379, 1998.
- [8] S.F .Williams,D.P. Martin, D.M Horowitz., O.P .Peoples, *PHA applications: Addressing the price performance issue. I. Tissue engineering. Int. J. Biol. Macromol.*, 25, 111-121, 1999.
- [9] L.Averous, *Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: a review .Journal of macromolecular Science –Part C, polymer Reviews 2004; vol C4 (N°3) :231-74.*
- [10] L. Averous, *biodégradables polymers (biopolymers)*, 2007.
- [11] K. G. Satyanarayana,G. G .CARizaga, F. Wypych, *biodegradables composites based on lignocellulosic fibres –An overview. Progress in polymer Science; 34 (9) : 982-1021,2009.*
- [12] P.Buri ; F.Puisieux ; E.Doelker : *formes pharmaceutiques nouvelles Edition : Paris, Technique et documentation ; 1985.*

- [13] Rama Dubey, T.C. Shami , K.U. Bhasker Rao, Microencapsulation Technology and Applications, Defence Science Journal, Vol. 59, No. 1, 82-95, 2009.
- [14] Seyed Ali Hashemi, Mojgan Zandi, Encapsulation Process in Synthesizing Polyurea Microcapsules Containing Pesticide, Iranian Polymer Journal, Vol 10; N° 4, 2001.
- [15] A.C.Albertsson, Degradable aliphatic polyesters, Advances in polymer science, Vol 157, PP 04-06, 2002.
- [16]F. detrez, R.Seguella, G.Coulon, Etude des mécanismes de déformation d'un polymère semi-cristallin : le poly (ϵ -caprolactone), 18^{ème} congrès Français de mécanique, 27-31, 2007
- [17]Cherdron Ohse,F .Korte,- Synthesis and characterization of polylactones Makromo. Chem, 56,179,(1962).
- [18]S.Fakirov, Biodégradable Polyesters: Synthèses, Propretés, Applications Chi Zhang, Biodegradable Polyesters, First Edition. Edited by Stoyko Fakirov, 2015.
- [19]B.Azimi, «Poly (ϵ -caprolactone) Fiber: An Overview», Journal of EngineeredFibers and Fabrics Volume 9, Issue 3 – University of Technology, Tehran, IRAN. 2014.
- [20]L.AZOUZ, «Elaboration de microsphère à base de polyester pour une application thérapeutique : microencapsulation de l'ibuprofène par la polycaprolactone et un copolymère polycaprolactone-g-polyéthylèneglycol», Mémoire de doctorat. Université A-Mira de Bejaia, 2016.
- [21]A.Kumar Behera, Dr. B.B.Barik, S.Joshi. «Poly- ϵ -caprolactone based microspheres and nanospheres »: a review FS J Pharm Res | 2012 | Vol 1 | No 2.
- [22]A .Wawrezinieck;J.P. Benoit; Médecine-Sciences, 24, 659-664(2008).
- [23]Jordi R.Marguerite R.Etude bibliographique sur les matériaux Issus de labiomasse végétale, Etude co-financée par Agrice (Ademe)(1998-1999).
- [24]H. Cherdron. Ohse, .F Korte. Makromolekulare Chemie, 56 , 179(1962).
- [25]A .Hofmann.Szyranski; R. Slomkowski; S .Penczek. , MakromolekulareChemie,185, 655 (1984).

- [26] A. Hofman; S. Slomkowski; S. Penczek. Makromolekulare Chemie, 188, 2027 (1987) .
- [27] H. Kricheldorf; I. Kreiser-Saunders. Makromolekulare Chemie, 191, 1057 (1990).
- [28] J. Richard., J.P. Benoit; Microencapsulation, Technique de l'Ingenieur . J 2210, p1 –20. ., (2000),
- [29] B. Boh, B. Sumiga, Microencapsulation Technology and its applications in building construction materials, RMZ Materials and Geoenvironment, Vol. 55, N°3, 329-344. (2008)
- [30] S. Giraud: Microencapsulation d'un diisocyanate et d'un phosphate d'ammonium - Application : élaboration d'un système polyuréthane monocomposant à propriété retardatrice de flamme pour l'enduction textile, Thèse de doctorat, Université Lille 1. (2002)
- [31] A. Nesterenko, (: Étude et fonctionnalisation de protéines végétales en vue de leur application en microencapsulation. thèse de doctorat, Université de Toulouse 2012).
- [32] Bojana Boh, Bostjan Sumiga, Microencapsulation technology and its applications in building construction materials, RMZ – Materials and Geoenvironment, Vol. 55, No. 3, 329-344, 2008.
- [33] R. Archady, biodegradable microencapsular drug delivery systems, manufacturing methodology, release control and targeting projects, Journal of bioactive and compatible polymer, Vol 5, 315-342, 1990..
- [34] 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
- [35] Joël Richard, Jean-Pierre Benoît, Microencapsulation, Technique d'ingénieur, J 2210
- [36] P. Buri ; F. Puisieux ; E. Doelker : formes pharmaceutiques nouvelles Edition : Paris , Technique et documentation ; 1985.
- [37] Simon Benita, Microencapsulation: Methods and industrial applications, 2eme Edition, Vol 158, PP 2-3, 2006.
- [38] Rama Dubey, T.C. Shami; K.U. Bhasker Rao, Microencapsulation Technology and Applications, Defence Science Journal, Vol. 59, No. 1, 82-95, 2009.

- [39] Kersch Naidoo, Heidi Rolfes, Kim Easton, Sean Moolman, Avashnee Chetty, Wim Richter, Roger Nilen , An emulsion preparation for novel micro-porous polymeric hemi-shells, *Materials Letters* 62 : 252–254, 2008.
- [40] K.Soppimath, T.M.Aminabhavi, A.R.Kulkarni, W.E Rudzinski, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *Journal of controlled release*, 1-20, 2001..
- [41] R. Bodmeier ; P.Maincent, Polymeric dispersions au drug carriers, *Pharmaceutical dosage forms*, Vol 3, 87-128, 1998
- [42] J.Kreuter; P.Speiser, In vitro studies of poly (methylemethacrylate) adjuvants, *Journal of pharmaceutical sciences*, 65 :1624-1627, 1976.
- [43] Jae Hyung Park, Mingli Ye; Kinam Park, Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs, *Molecules* Vol 10, 146-161, 2005
- [44] Roseane M.Ribeiro-Costa, Antonio J.Alves, Noemia P.Santos, Silence C.Nascimento, Eugênia C.P. Gonçalves, Nicacio H.silva, nelly K.Honda, Nereide S.Sanos- Magalhaes, In vitro and in vivo proprieties of using acid encapsulated into PLGA- microspheres, PP 11-12, 2003
- [45] P.Burie, F.Puisieux, E.Doelker, *Formes pharmaceutiques nouvelles*, Technique et documentation, Edition : Paris, 1985
- [46] E.Dellacherie, G.Ruxandra, and Q.Patricia, Les nanosphères « furtives » comme nouvelle formes galéniques injectables : espoir et réalités », *medecin/science*, Vol 17, 619-626, 2001
- [47] M.F.Zambaux, F.Bonneaux, R.Gref, P.Maincent, E.Dellacherie, M.J.Alorsa ; C.Vigneron, Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method , *Journal of controlled release*, 50(1-3), 31-40, 1998
- [48] 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.
- [49] Alfonso, R. G., *Remington: The Science of Practice Of Pharmacy*, Vol-2, 890-891.
- [50] Seyed Ali Hashemi, Mojgan Zandi, Encapsulation Process in Synthesizing Polyurea Microcapsules Containing Pesticide, *Iranian Polymer Journal* , Vol 10; N° 4, 2001

[51] 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

[52] C. Arroudj, H. Benameur: Etude d'un procédé de microencapsulation par émulsification d'un principe actif anti-inflammatoire et caractérisation biopharmaceutique. Mémoire de master. Université A. Mira. Béjaia (2006)

[53] T. Vandamme, D. Poncelet, Subra-Paternault, Micro encapsulation : des sciences aux technologies, Tech et Doc, Paris (2007)

[54] F.G. Bernard, Selim K., A. Inteaz, et al, Encapsulation in the food industry: a review. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 50, 213-217 (1999).

[55] Z. Mohammedi, Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région du Tlemcen, Thèse de magistère, Université-Abou Bakr Belkaid-Telemcen (2005).

[56] K. Bouhadjra, étude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge; thèse pour l'obtention du diplôme de magister, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou (2011).

[57] Z. Hellal, Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou (2011).

[58] R. Yaacoub., Impact nutritionnel et sanitaire de la torréfaction des fruits et graines oléagineux; l'intérêt de la fluorescence comme outil de contrôle des composés néoformés; thèse de doctorat; N° 2009AGPT 0048; Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agro paris tech)

[59] J. R. Klimenberg; S. E. Goldfinger; J. E. Seegmiller, *Ann. Intern. Med.* 62, 639, 1965.

[60] J. J. Marr; R. L. Berens, *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 323, 1983.

[61] O. Moukha-chafiq, M. L. Taha., H. B. Lazrek, J. J. Vasseur, C. Pannecouque, M. Witvrouw, E. D. Clercq. *Il Farmaco.* 57, 27, 2002.

[62] J. Metzner, E. Lippmann, F. G. Weber, G. Westphal; *Pharmazie*, 36, 388, 1981.

- [63] L.E. Seitz, W.J. Suling, R.C. Reynolds; J. Med. Chem., 45, 5604,2002.
- [64] L.L. Zaika.,J. Food Safety, 9,97., 1998.
- [65]M.D. Smith, P.L. Navilliat, J.Microbiol.Meth, 28, 21, 1997.
- [66] C.M. Mann, J.L.Markham., J.Appl. Microbiol, 84, 538, 1998.
- [67]M. Lahlou, Phytotherap. Research, 18, 435, 2004.
- [68]M.F. Belier- Maurel, Rivista Italia, ,58, 283,2000.
- [69]J.L. Fauchère, L. Avril, « Bactériologie générale et médicale », Ellipses, 2002.
- [70]S.M.Tharib., S.O. Gnan. G.B.A. Veitch,J.Food. Prot.,48, 681, 1998.
- [71]S.G .Deans. G.Ritchie, Int. J.Food Microbiol, 5, 162, 1987.
- [72]Lis- Balchin.M, Hart. S.L., Phytotherap. Research, 14, 623, 2000.
- [73]Burt. S.A, Reinders. R.D, Lett. Appl. Microbiol., 36, 162, 2003.
- [74]M.L. Faleiro ,M. G.Miguel. , Lett. Appl. Microbiol., 36, 35, 2003.
- [75]Kunle. O., Okogun. J., Egamana. E., Emojevwe. E., Shok M. J. Phytomed.; 10, 59;2003.

Chapitre II :

- [1] Nina Quelenis, Les bioplastiques: caractéristiques et réglementation, Fiche technique emballage, Fiche N° 45, Avril 2008.
- [2] Keizo Makuuchi, Fumio Yashii, Shin Haxegawa, Hiroshi Mitonmo, Process for producing crosslinked polycaprolactone, Vol 19, N° 5, 977- 203, 1999.
- [3] P. K. Manna; al.: Preparation and evaluation of a new erythromycin derivative – Erythromycin taurate, Acta Pharm. 54 231–242(2004).
- [4]Masse molaire calculée d'après « Atomic weights of the elements 2007 » [archive], sur www.chem.qmul.ac.uk.

Résumé :

Ce travail est constitué d'une synthèse bibliographique et une partie expérimentale qui consiste en la préparation de plusieurs microsphère à base de PCL et de principe actif (érythromycine et quercitine) ensuite une étude de libération contrôlée de la quercitine a été effectuée des pH=7.4 .pH=1.2 pour confirmer le taux élevé :80%trouvé dans pH=7.4 nous avons réalisé une étude d'activité antioxydante qui a révélé la réduction du radical DPPH par des prélèvements cinétiques utilisés pour le calcul de taux de quercitine libérée . Cette étude a confirmée le caractère de libération progressive de principe actif pour la deuxième formulation PCL+érythromycine, une étude d'activité antibiotique a été réalisée qui a permis d'évaluer les diamètres d'inhibition des trois souche E-coli, staph, pseudo en milieu solide qui a rejoint le milieu liquide.

Les résultats trouvés sont satisfaisants et nous avons atteint notre but recherché.

Mots clés : encapsulation, PCL, DPPH, antibiotique, activité antioxydant.

Abstract:

This work consists of a bibliographic synthesis and an experimental part consisting of the preparation of several microspheres based on PCL and active principle (erythromycin and quercitin) then a release study(erythromycin and quercitin) a controlled release study of quercitin was performed PH = 7.4 .PH = 1.2 to confirm the high rate: 80% trovea in PH = 7.4 we carried out a study of antioxidant activity that took place production of the radical DPPH per kinetic samples used for calculation of quercitin cough released. This study has confirmed the progressive release of active principle for the second

formulation PCL + erythromycin has a study of antibiotic activity was carried out which has led to deleterious inhibition diameters of trios strain E-coli, staph, pseudo solid medium which joins the liquid medium.

The results found are selisfecisonts and we have extinguished our purpose

ملخص:

يتكون هذا العمل من تركيب بيبليوغرافي وجزء تجريبي يتكون من تحضير العديد من الكريات المجهرية على أساس PCL et المكون النشط (الاريثرومايسين و quercitin) ، ثم تم إجراء دراسة تحريرية عن quercitin باستخدام pH = 7.4 . درجة الحموضة = 1.2 لتأكيد المستوى العالي: 80 ٪ وجدت في الرقم الهيدروجيني = 7.4 أجرينا دراسة من النشاط المضاد للأكسدة التي كشفت عن تخفيض DPPH جذري بواسطة العينات الحركية المستخدمة لحساب مستويات quercitin صدر. هذه الدراسة أكدت مبدأ إطلاق سراح الطابع التدريجي نشط في الصيغة الثانية PCL + érythromycine ، أجريت دراسة نشاط المضادات الحيوية التي سمحت لتقييم أقطار تثبيط السلالة الثلاثة Staph ، E-coli ، الزائفة في الوسط الصلب الذي انضم إلى الوسط السائل. النتائج التي توصلت إليها مرضية وقد حققنا هدفنا.

Mots clés : encapsulation, PCL, DPPH, antibiotique, activité antioxydant.