

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



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

Mémoire

Présenté par.

Melle MECHRAOUI FATIMA ZOHRA
Melle AOUCI NAWEL

Pour obtenir le diplôme de

Master II

Filière : Chimie
Spécialité: CHIMIE ORGANIQUE

Sujet :

**Extraction d'un polymère à base du coton
et étude de son activité biologique**

Soutenu le : 26/06/2019

Devant le jury:

Mme BALEH .H	Présidente	MAA	UNIV .Tiaret
Mme MEDJBER.N	Examinatrice.	MCB	UNIV .Tiaret
Mme BENNABIL	Promoteur	MCB	UNIV .Tiaret
Mme ABEDELMALEK.I	Co-promoteur	MCB	UNIV .Tiaret

Année Universitaire : 2018/2019

REMERCIEMENTS

*Je remercie vivement M^{me} **BENNABI .L Maitre de conference B.** (UNIV. IBN KHALDOUN. Tiaret) et mon coencadreur M^{me} **ABEDELMALEK .I Maitre de conference B.** (UNIV. IBN KHALDOUN. Tiaret), pour leurs aides et leurs disponibilités pour la réalisation de ce travail*

*Mes vifs remerciements vont à Monsieur le Professeur **BELARBI** et Mr le professeur **BOUAZZA** pour leur aide , de nous avoir donné libre accès a leur laboratoire et de nous avoir facilité la tache afin de concrétiser ce travail .*

*On adresse nos très sincères remerciements à Madame la présidente **BALEH.H**Maitre assistant A. (UNIV. IBN KHALDOUN. Tiaret) pour avoir accepté de juger notre travail en voulant présider ce jury .*

*On exprime toute notre reconnaissance et notre gratitude à Madame **MEDJBER .N Maitre de conference B.** (UNIV. IBN KHALDOUN. Tiaret) pour sa participation au jury*

*On remercie vivement tous les enseignants qui ont participer a notre formation durant notre cursus ,le Chef du département **Dr YSERF.D** de Chimie pour avoir assurer la bonne marche des les soutenances au délais, et les techniciens du labo de Chimie et les labo de recherches pour leurs aide et disponibilité et leurs travail pour améliorer notre travail :*

*Mr **LARBI**, M^{me} **Soumia**, M^{me} **Nadia**, Mr **HADIDI**, M^{me} **Fatiha**, M^{me} **BENZERROUK**, on remercie aussi M^{lle} **Sediri** pour son aide*

Je souhaite à remercier tous les gens qui nous ont encouragé et soutenue durant la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à:

*A mes très chers parents qui m'ont soutenue moralement
Et financièrement et leurs tendresse que'Allah me les garde
durant toute ma vie.*

A mes très chères sœurs

Khadidja, Asma, Chaimaa, Inass, Assil, Anfal

A mes frères : Ali, Mustapha, Abdellah

A Mon grands parents

A Mes Oncles

A mes amies intimes : Sara, Fatima, Nawal,

Imen, Ikram ,Djamila, Hanan, Khawla, Faiza

A toute la famille

Mechraoui, Chikhaoui, Chandad

*Toutes les personnes chers a mon cœur que je n'ai pas cité
et qui se reconnaîtrons dans ma*

Dédicace.

A tous ma promotion de chimie organique

2018|2019

M. FATIMA

Dédicace

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tous simplement que : Je dédie ce mémoire

A Ma tendre Mère: Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

A Mon très cher Père: que dieu te garde pour moi dans toute la vie. Ce travail et le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.

A mon très cher frères Islam ,mhamedet mes sœurs :, Ikram et Asma ,Imen , Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel m'ont permis de réussir mes études.

A mes oncles et mes tantes

A mes chères amis et mes collègues.

A. NAWEL

Sommaire

Introduction générale.....	1
Référence bibliographiques.....	2

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie I : La cellulose et ces dérivés

I-1- La cellulose.....	3
I.1.1 Généralité	3
I.1.2 Structure	4
I.1.3 Caractéristiques physico-chimique.....	5
I.1.3.1 les liaisons hydrogène	5
I.1.3.2 Le gonflement de la cellulose	7
I.2. Les solvants de la cellulose.....	8
I.2.1 Les solvants non dérivatisants	8
I.2.2 Les solvants non-aqueux	9
I.3 La fonctionnalisation de la cellulose	10
I.3.1 Ethérisation de la cellulose	10
I.3.2 Estérisation de la cellulose	11
I-2-Acétate de cellulose	11
I.2.1 Généralité	11
I.2.2 Elaboration et composition chimique	12
I.2.3 Les applications de l'acétate de cellulose	14

Partie II : La Microencapsulation

II. 1.1 Définition	15
II.1.2 classification des microparticules	15
II.1 3 Technique d'encapsulation.....	16
II.1.4 Les différents procédés de microencapsulation.....	17
II.1.4.a) Procédéschimiques.....	17
II.1.4.b) Procédés mécanique.....	20
II.1.4 c) Procédés chimiques.....	21
II. 1.5. Techniques de caractérisation des microcapsules.....	23
II.1. 6 Application de la microencapsulation.....	24
L'activité Antioxydante et antibiotique.....	27
III. 1.Antioxydants.....	25
III. 1. 1 Définition.....	25
III. 1. 2 Mécanisme d'action.....	25
III. 1. 3. Utilisation des antioxydants.....	26
III. 1. 4. Classification des antioxydants.....	26
III. 1.4.a) Antioxydants synthétiques.....	26
III. 1. 4.b) Substances synergiques.....	26
III. 1. 4. C) Antioxydant d'origine végétale.....	27
III. 1.5.Evaluation de la capacité antioxydante par des tests in vitro	28
III. 1. 5. a) Test DPPH.....	28
III. 2. L'activité antibiotique :.....	29
III. 2.1 Introduction.....	29
III. 2.2 Micro-organismes utilisés.....	29
II.2.3.Les Antibiotiques.....	30

II. 2.3. 1 Paramètres d'activité d'un antibiotique.....	30
II. 2.3. 2 Méthodes d'étude de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques.....	31
II. 3.4.1 Techniques d'études in vitro du pouvoir antimicrobien.....	31
II. 3.4.2 Technique d'étude sur milieu solide.....	31

Etude Expérimentale

Partie I : Synthèses et Caractérisations.....	33
I.1. Produits et Matériels utilisée	33
I.1.1. Les produits	33
I.1.2. Matériels	33
I.1.3. Identification des produits.....	34
I.1.3.c. La gélatine	35
I.1.3.b) Quercétine	35
I.1.3.c) L'érythromycine	36
I.2. Synthèse chimique de triacétate de cellulose « CTA »	38
I.2.1. Mode opératoire	38
I.3. Préparation des microparticules à base de Triacétate de cellulose	
Gélatine.....	38
I.3.1. Mode opératoire.....	38
I. 3.2. Etude cinétique	41
I. 3.2.a) Composition du milieu d'étude	41
I.3.2. b) La détermination de la longueur d'onde maximale par UV-Vis	41
I.2.3.c). Etalonnage de principe actif.....	42
I.4. Caractérisations du CTA	45
I.4.1. Analyse calorimétrique différentielle DSC.....	45
I.4.2. Résonance Magnétique Nucleaire.....	46

I.4.3. Etude de spectroscopie infra rouge des microsphères de CTA	48
I.5. Résultats de la cinétique libération.....	48
I.5.1. Mode opératoire.....	48
I.6 Analyse de l'incorporation du PA par Infra rouge	53
I.6.1 Spectrophotomètre infrarouge à transformé de Fourier.....	54
I. 6.2. Spectroscopie Infrarouge CTA.....	55
I. 6.3. Par DRX	55
Partie II : L'activité antioxydants et antibiotique..	57
II. 1. L'activité antioxydants.....	57
II. 1.1. Introduction.....	57
II. 1. 2.Évaluation de pouvoir antioxydant	57
II. 1.3. Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1- picrylhydrazyl)	57
II. 1.4. Mise en oeuvre pratique	58
II. 1.4.1 préparation de solution DPPH.....	58
II. 1.4.2. mode de opératoire.....	58
II. 2. L'activité antibiotique.....	59
II.2.1. Introduction.....	59
II. 2. 2 Antibiogramme	59
II. 2.2.a) Procédure de diffusion en gélose : (3) (4).....	60
II.2. 3. Mode opératoire	60
II.2. 3.1. Préparation de la suspension	60
II.3 Activité antibactérienne du CTA	61
II.3.1. L'activité bactérienne du CTA	61
II.4 .1 La méthode en milieu liquide	62
II.4.2 . La méthode de diffusion par disque	62
II.5 Résultats des tests biologiques.....	63
disussion.....	64
Conclusion	67
Annexe	

Liste de figures

N° de la Figure	Légende
Figure 1	Représentation de la molécule de cellulose
Figure 2	Les régions cristallines et amorphes dans les microfibrilles cellulose (Navi &Heger, 2005)
Figure 3	Numérotation des carbones d'une unité cellobiose
Figure 4	Ponts hydrogènes intramoléculaires et intermoléculaires entre de Macromolécules adjacentes de cellulose (Navi &Heger, 2005)
Figure 5	Composition chimique des acétates de cellulose
Figure 6	Acétylation de la cellulose
Figure 7	Schéma représentant la morphologie des microparticules
Figure 8	Principe de l'encapsulation par coacervation
Figure 9	Procédé de microencapsulation par évaporation de solvant à partir d'une émulsion E/H
Figure 10	Préparation des microsphères par fusion à chaud
Figure 11	Différentes étapes de la fluidisation
Figure 12	Mécanisme de formation des microparticules par polymérisation interfaciale
Figure 13	Illustration de la méthode de diffusion sur boîte Pétri (ZAIKI, 1988)
Figure 14	La structure chimique de la Quercétine
Figure 15	La structure chimique de l'érythromycine
Figure 16	Dispositif expérimental de la synthèse des microparticules
Figure 17	photo MPsd des microparticules
Figure 18	Courbe d'étalonnage de QR à pH=1.2 (374nm)
Figure 19	Courbe d'étalonnage de QR à pH=7.4 (386nm)
Figure 20	Courbe d'étalonnage de l'érythromycine à pH=1.2 (286nm)
Figure 21	Courbe d'étalonnage d'ER à pH=7.4 (268nm)
Figure 22	Thermogramme DSC du CTA
Figure 23	spectre RMN ¹ H CTA CDCl ₃ (7.28 CDCl ₃)
Figure 24	spectre RMN ¹³ C CTA CDCl ₃ (77.048 CDCl ₃)
Figure 25	RMN C13
Figure 26	Spectre infra rouge des microparticules En Triacetate de cellulose
Figure 27	le dispositif expérimental de la libération du PA

Liste de figures

Figure 28	Le taux de libération de QR en fonction du temps
Figure 29	Le taux de libération d'ER en fonction du temps
Figure 30	Le taux de libération de QR en fonction du temps a partir des microparticules soumises a une source UV
Figure 31	Spectre Infrarouge de QR
Figure 32	Spectre Infrarouge de MCS de QR
Figure 33	Spectre Infrarouge de CTA
Figure34	diffractogramme des microparticules de triacétate de cellulose
Figure35	Le diffractogramme QR
Figure36	Piégeage du radical libre DPPH
Figure37	Les résultats de la capacité d'inhibition de DPPH
Figure38	Les 3 souches bactériennes ; a : E. coli et c : S. aureus.b : Bacillus subtilis
Figure39	résultats après 24H des 3 souches bactériennes
Figure40	La méthode de dilution en milieu liquide
Figure41	Evolution des DO des souches S.bacillus après 24h
Figure42	Evolution des DO des souches E.coli après 24h
Figure43	Evolution des DO des souches STAF après 24h

Liste des tableaux

Tableau 1	propriétés physico-chimiques de cellulose
Tableau 2	Propriétés physiques et chimiques de l'acide éthanoïque, acide sulfurique et l'anhydride éthanoïque
Tableau 3	Propriétés physico-chimiques et mécaniques de la gélatine
Tableau 4	Propriétés physiques et chimiques de quercitrine
Tableau 5	Propriétés physiques et chimiques d'ER.
Tableau 6	Les valeurs des λ_{\max} de l'érythromycine dans les différents milieux
Tableau 7	Les valeurs des λ_{\max} de Quercetin dans les différents milieux
Tableau 8	Valeurs de ε du ER à pH=1,2 et pH=7,4 à 37°C.
Tableau 9	Valeurs de ε du QR pH=1,2 et pH=7,4 à 37°C
Tableau 10	Diamètre de la zone claire du CTA
Tableau 11	Les diamètres obtenus pour E-COLI en fonction du temps de la libération d'ER.
Tableau 12	Les diamètres obtenus pour bacillus .S. en fonction du temps de la libération d'ER
Tableau 13	Les diamètres obtenus pour STAF.A en fonction du temps de la libération d'ER

Liste des abréviations

CTA	Triacétate de Cellulose
PA	Principe Actif
DRX	Diffraction de rayon X
Mps	Microparticules
MCs	Microsphères
CMC	Concentration Micellaire Critique
E/H/E	Emulsion eau dans l'huile dans l'eau (émulsion double)
H/E	Emulsion l'huile dans l'eau
ER	l'érythromycine
QR	Quercétine
FT-IR	Infra rouge a transformé de fourrier
RMN	Résonance magnétique nucléaire
DSC	digital scanning calorimétrique
E.COLI	Escherichia coli
S.Bacillus	Bacillus subtilus
STAPH	Staphylococcus aureus



Introduction générale

Depuis le début du siècle dernier le développement de la science des polymères s'est accompli grâce aux progrès de la chimie. La chimie apporte des fonctions nouvelles ou assemble différentes fonctions pour répondre aux nouveaux besoins de l'industrie dans les applications biomédicales, pharmaceutiques ou environnementales (1)

Parmi les polymères naturels les plus intéressants pour l'industrie pharmaceutique pour l'encapsulation des substances actives : la cellulose et ses dérivés ; qui est l'un des constituants essentiels du coton. Le coton qui est une matière cellulosique pratiquement pure utilisée pour produire des polymères fibreux (2) ; tel que le triacétate de cellulose qui l'objet de notre étude, ce dernier possède une structure formée d'unités monomérique, de β -Dglucopyranose, liées à travers des liaisons 1,4- β glucosidiques, se sont des polymères sélectionnés en fonction de l'usage final (issues du bois et des végétaux) (3), les fibres de transformation (viscose), les fibres synthétiques et les mélanges peuvent recevoir certains traitements ou être associés à des compléments selon les qualités recherchées: hydrophile ou hydrophobie, perméabilité.

Les premières publications sur la micro encapsulation et ses applications possibles dans le domaine pharmaceutique remontent à 1931. Les développements technologiques récents ont permis à la micro encapsulation de devenir une partie très importante de la recherche scientifique avec un certain nombre d'applications industrielles (4) beaucoup de substances sont encapsulés afin de les préserver en vue de détérioration par un milieu au qu' elle ils soumis ou en large contact avec ce dernier , ou encore en utilisant des principes actifs souvent désagréable au goût l'encapsulation s'avère la meilleure technique a présent pour masqué le goût des médicaments comme les antibiotiques ou encore elle arrive a préservé une fois l' antioxydant dispersé dans une matrice vis-à-vis de l' oxydation ou a la lumière afin de préserver son efficacité , dans cette optique s' inscrit notre recherche dans laquelle on va tester une méthode d' encapsulation est essayer d' évaluer activité biologique des principes actifs choisis

Ce travail, se compose de deux parties :

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

- la description du polymère naturel : la cellulose les principaux dérivés et leurs propriétés.
 - La micro encapsulation des molécules actives
 - Une recherche sur l'activité antibiotique et l'activité antioxydant
- 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'évaporations de Solvant en utilisant comme matrices le CTA, les microparticules sont caractérisés par des différentes techniques d'analyses.

La seconde partie comporte l'étude cinétique de libération du principe actif (la quercitrine) et antibiotique (érythromycine).

On termine notre travail par une conclusion générale et perspective

(1) K. H. Hsieh, T. H. Young, J. C. Salamone, In Polymeric materials encyclopedia, (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 1996.

(2) D.Klemm, B.Heublein, HP.Fink, A.Bohn, Angrew.Chem, Int.Edit, 44,3358, 2005.

(3) E. Fredon, Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier de Toulouse, pp173, 2001.

(4)Salsac A.V, (2017): Modelling and characterization of microcapsules. Biomechanics & Bioengineering Laboratory (UMR CNRS 7338), Université de Technologie de Compiègne, France.

A large orange arrow pointing to the right, with a white outline, containing the chapter title.

Chapitre I :
Etude bibliographique

Partie I : la cellulose et ces dérivés

I.1 La cellulose :

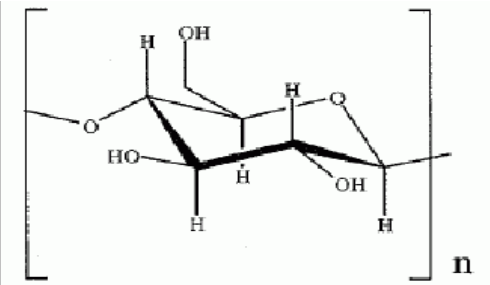
I.1.1 Généralité :

La cellulose est le polymère d'origine naturelle le plus abondant sur terre.

Cette macromolécule est produite essentiellement par le processus biochimique de photosynthèse (1).

Elle représente environ 50% de la biomasse et les végétaux en produisent 50 à 100 milliards de tonnes par an. Elle est le principal constituant de la paroi cellulaire des plantes et du bois (jusqu'à 95% dans les fibres de coton et de 40 à 55% dans le bois) (2). Les fibrilles cellulosiques assurent le soutien et la protection des parois cellulaires des végétaux. Ce polysaccharide est également biosynthétisé selon un processus différent par une bactérie: acetobacter xylinum. On trouve aussi de la cellulose sous une forme très cristalline dans certaines algues comme la valonia ventricosa (1).

Tableau.1 : propriétés physico-chimiques de cellulose

Nom	Cellulose
Masse molaire (g/mol)	162,1406
Formule brute	$(C_6H_{10}O_5)_n$
Structure chimique	 The diagram shows the chemical structure of a cellulose repeating unit. It consists of a glucose ring in its cyclic form, enclosed in large square brackets with a subscript 'n' at the bottom right. The ring is connected to the next unit via an oxygen atom at the C1 position. The C2, C3, and C6 positions have hydroxyl groups (OH) attached, while the C4 position is connected to the next unit. The C5 position has a hydrogen atom (H) attached. The C1 position also has a hydrogen atom (H) attached.
Température de fusion	>150 °C
Paramètre de solubilité	32,02 MPa ^{1/2}
Masse volumique	32,02 MPa ^{1/2}

I.1.2 Structure:

En 1838, un chimiste français, Anselm Payen, a réussi à isoler la cellulose à partir de différentes plantes. Il a fallu ensuite attendre un peu plus de cinquante ans pour déterminer sa formule chimique basique révélée par Weillstater (3).

La composition élémentaire massique des macromolécules de cellulose est de 49,4 % en oxygène, 44,4 % en carbone et de 6,2 % en hydrogène (2).

La cellulose est un polysaccharide de la série des β -D glucanes (**Figure 1**). Son motif répétitif est le cellobiose.

Ce dernier est constitué de deux β -D-glucopyranoses (unité anhydroglucose ou AGU) dans leur conformation chaise et liés par une liaison glycosidique $\beta(1\rightarrow4)$ ce qui lui confère une structure linéaire contrairement à celle de l'amidon (les monomères glucoses de l'amidon sont liés par des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ et $\alpha(1\rightarrow6)$).

L'extrémité réductrice (R) du polymère correspond à l'unité AGU dont le carbone anomérique n'est pas lié à une autre unité glucidique. Il existe donc un équilibre entre la forme hémiacétale et la forme aldéhyde réductrice minoritaire. L'unité glucose située à l'autre bout de la chaîne cellulosique est appelée extrémité non-réductrice (NR) car le carbone anomérique est engagé dans une liaison glycosidique $\beta(1\rightarrow4)$. De ce fait, il ne peut pas y avoir d'équilibre entre la forme hémiacétale et la forme aldéhyde (2).

Certaines réactions de dégradation commencent par l'extrémité réductrice.

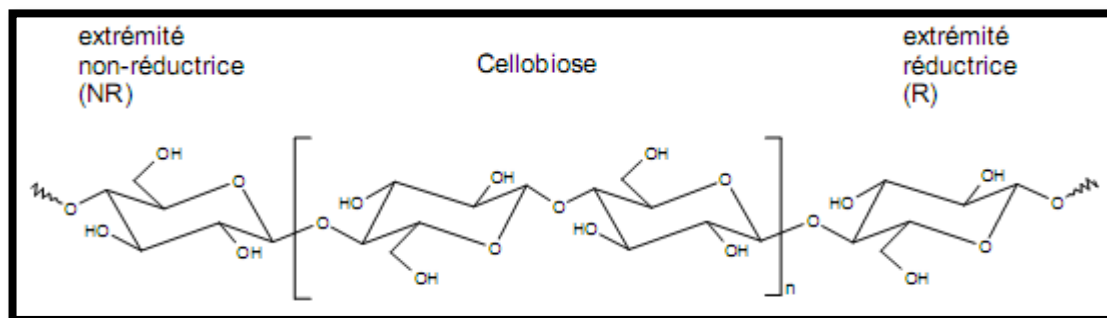


Figure 1 : Représentation de la molécule de cellulose (4)

Le nombre d'unités AGU correspond au degré de polymérisation de la cellulose (DP). Il varie entre 400 et 14000. Le maximum est atteint pour la cellulose native (n'ayant subi aucun traitement). En moyenne, après traitement de purification, les celluloses possèdent un DP de 2500 (2).

La masse molaire du motif élémentaire de la cellulose (AGU) est de 162,1 g.mol⁻¹. Différentes grandeurs caractéristiques classiques permettent de définir les longueurs de chaînes moyennes des polymères (5).

1.1.3 Caractéristiques physico-chimiques de la cellulose :

La cellulose possède des régions cristallines et des régions amorphes. Les liaisons hydrogènes étant beaucoup plus nombreuses dans la première. Le taux de cristallinité de la cellulose est de 40 à 50% pour le bois, 60% pour le coton et supérieur à 70% pour certaines algues marines (6).

Dans ce paragraphe nous étudierons la cause de cette cristallinité et ses conséquences sur les propriétés physico-chimiques de la cellulose.

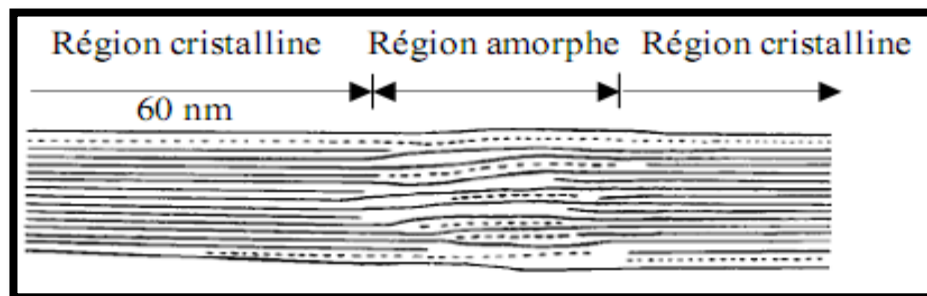


Figure 2 : Les régions cristallines et amorphes dans les microfibrilles cellulose (Navi & Heger, 2005)

1.1.3.1 Les liaisons hydrogène :

Les AGU possèdent 3 groupements hydroxyles dont 2 fonctions alcools secondaires (en position 2 et 3) et un alcool primaire (en position 6). Ces groupes hydroxyles, ainsi que les liaisons glycosidiques, se situent en position équatoriale par rapport au plan cycle (**Figure 3**).

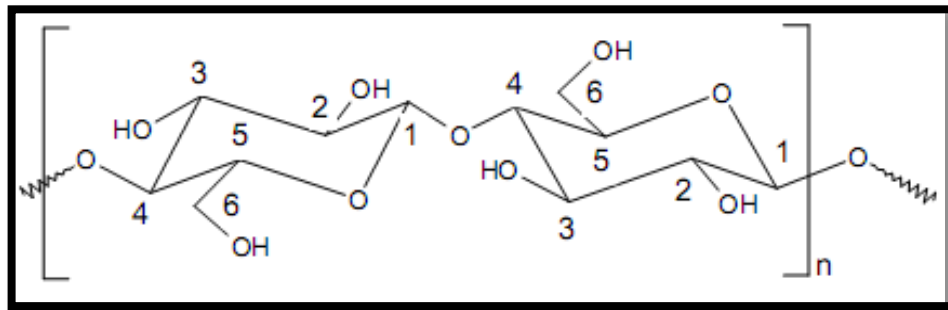


Figure 3 : Numérotation des carbones d'une unité cellobiose

Cette conformation favorise la formation de liaisons hydrogènes intra et surtout intermoléculaires (**Figure 4**).

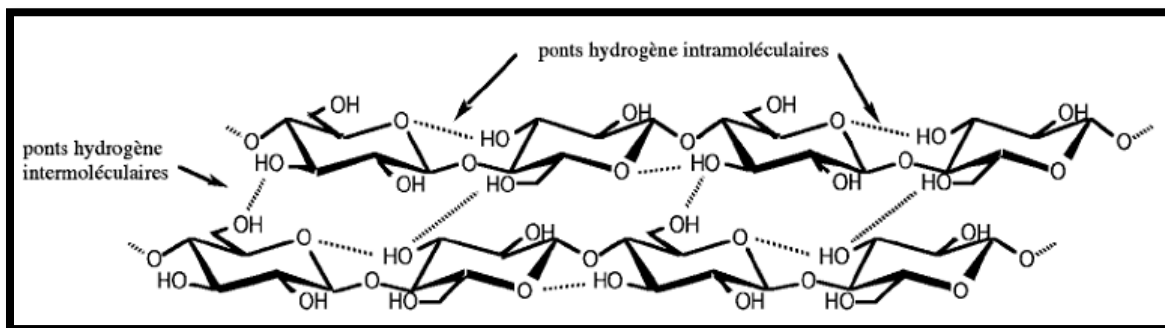


Figure 4 : Ponts hydrogènes intramoléculaires et intermoléculaires entre de Macromolécules adjacentes de cellulose (Navi & Heger, 2005)

Ces liaisons hydrogènes ont plusieurs conséquences.

Tout d'abord, du fait de leur grand nombre et de leur agencement, elles confèrent aux fibres de cellulose une très grande résistance mécanique. Puis, la cellulose est très difficilement soluble car il est peu aisé de rompre toutes ces interactions. Enfin, elle n'est pas fusible car la température nécessaire à la rupture de ces liaisons hydrogènes est supérieure à celle de la décomposition de la molécule, qui a lieu par rupture du cycle glucopyranosique.

La structure cristalline de la cellulose est très complexe et il existe différentes organisations cristallines appelées I, II, III, IV, ou encore I α , I β , IIII, IIIII, IVI et IVII.

Dans son état naturel, la cellulose est en configuration cristalline I. Après de nombreuses études, il a été découvert un dimorphisme de la cellulose I **(6, 5)**.

En réalité, la Cellulose I est constituée de deux structures différentes, les celluloses I α et I β .

Il aura fallu attendre l'apparition de la RMN du ^{13}C par « cross-polarisation - magic angle spinning » (CP- MAS) pour décrire ces deux états natifs de la cellulose. La cellulose I α est composée d'une phase triclinique à chaîne unique alors que la cellulose I β est composée d'une phase monoclinique à deux chaînes parallèles **(6, 7)**.

La cellulose I est majoritaire dans la cellulose produite par les bactéries et les algues alors que la cellulose I β est plus commune dans la cellulose produite par les végétaux.

Le taux de cristallinité de la cellulose peut être mesuré par plusieurs méthodes.

Les plus courantes sont la spectroscopie infrarouge (rapport des aires de bandes caractéristiques), la diffraction des rayons X (différence de spectres entre la cellulose I et la cellulose II) et la spectroscopie RMN du ^{13}C . Un résumé détaillé des différences entre les allomorphes de la cellulose et de leur caractérisation par toutes les méthodes usuelles a été fait par Pérez en 2005 **(2)**.

1.1.3.2 Le gonflement de la cellulose :

Le double caractère de la cellulose (à la fois cristalline et amorphe) induit une pénétration en deux étapes d'un composé au sein de la cellulose.

La première étape, la plus aisée, est la pénétration de la zone amorphe de la cellulose.

Il provoque un gonflement intercrystallin. Lorsque le composé pénètre dans les régions cristallines, il induit un gonflement intracrystallin.

Tous les composés ne peuvent pas atteindre l'intérieur de la zone cristalline. L'eau par exemple n'entraîne qu'un gonflement intercrystallin de la fibre de cellulose **(8)**. Aussi, la quantité d'eau maximale qui peut être contenue dans les parois d'une cellule de bois (point de saturation) varie entre 0,31 et 0,62 gramme par gramme de matière sèche **(9)**.

Cette quantité varie avec la provenance de la cellulose, son traitement, ou l'histoire des séchages et réhumidifications **(9)**.

Le gonflement intercrystallin a aussi été étudié avec des solvants organiques **(10, 11)**.

Comparés à l'eau, des solvants aussi bien protiques qu'aprotiques présentent des pouvoirs gonflants plus importants que l'eau (le formamide, le diméthyl sufoxyde et l'éthanolamine) alors que les alcools gonflent beaucoup moins la cellulose **(12, 13)**.

Certains composés sont capables de passer au travers de la barrière de la cristallinité et engendrent un gonflement dit intracristallin. Bien que pénétrant la cellulose au plus profond de sa structure, ils ne sont pas capables de la dissoudre.

Les hydroxydes de sels alcalins (dont La soude utilisée dans le procédé de mercerisage), les amines et l'ammoniac liquide font partie de cette catégorie **(14)**.

Les produits engendrant un gonflement inter et intracristallin de la cellulose sont utilisés pour des réactions en phase hétérogène. Pour mener des réactions en phase homogène, il faut solvater la cellulose. A cette fin, les solvants décrits dans le paragraphe suivant sont utilisés.

1.2 Les solvants de la cellulose:

Bien que très organisée, la cellulose peut être dissoute dans certains systèmes. Une analyse de la littérature fait apparaître un nombre assez restreint de ces systèmes.

Ils peuvent être classés en deux catégories : soit la dissolution de la cellulose se fait sans aucune modification chimique de celle-ci (on dit que les solvants sont non dérivatisants), soit la dissolution est réalisée grâce à une modification du biopolymère (on parle dans ce cas de solvant dérivatisant) **(15)**.

1.2.1 Les solvants non dérivatisants :

Les solvants non dérivatisants peuvent être séparés en trois catégories :

Les solvants aqueux **(15)**.

Ce sont principalement des solutions de sels inorganiques ou des complexes de métaux de transitions avec des amines ou NH₃.

Les plus connus sont le Cuam (Hydroxyde decuprammonium) et le Cuen (hydroxyde de cupriethylenediamine).

Les deux composés permettent de solubiliser la cellulose jusqu'à des concentrations de 10% si son degré de polymérisation ne dépasse pas 1000.

Ils sont aussi utilisés pour la mesure du degré de polymérisation de la cellulose : le degré de polymérisation est directement lié à la viscosité de solution de cellulose dans ces solvants (méthode décrite dans la norme TAPPI T230 pour le Cuen).

Il y a deux inconvénients majeurs à l'utilisation des Cuen et Cuam : ils ne sont pas stables à la lumière et ils dégradent la cellulose par oxydation.

Des solutions de soude (NaOH) de concentration comprise entre 6 et 10% en masse permettent la dissolution de la cellulose à faible température.

La solubilisation est améliorée en ajoutant de l'urée au système (2 à 4 % en masse) **(16)**.

1.2.2 Les solvants non-aqueux :

Des systèmes de sels dans des solvants non-aqueux sont très répandus pour dissoudre la cellulose **(16)**.

Le premier exemple est un mélange de 72,1% de thiocyanate d'ammonium, 26,5% d'ammonium et 1,4% d'eau, et il permet de dissoudre jusqu'à 14% de cellulose en masse. Le deuxième exemple est le système LiCl/DMAc (chlorure de lithium dans le *N,N*-diméthylacetamide) est un solvant très utilisé pour la fonctionnalisation de la cellulose. La concentration optimum pour dissoudre la cellulose est 9% de LiCl dans le DMAc.

Des solutions jusqu'à 16% en masse peuvent être réalisées avec des celluloses de faibles degrés de polymérisation.

Les solutions de cellulose sont très stables mais il faut activer la cellulose pour les obtenir. Le dernier exemple est l'un des plus utilisés industriellement : c'est le *N*méthylmorpholine-*N*-oxyde (NMMO).

Ce système est connu pour la régénération de la cellulose dans le procédé Lyocell **(17)**.

Un dernier système permettant de dissoudre la cellulose est le mélange DMSO/TBAF (*N,N*-diméthylformamide / fluorure de tetrabutylammonium trihydraté).

Ce système permet de dissoudre la cellulose possédant un degré de polymérisation de 650 maximums rapidement (en quelques minutes) sans aucun prétraitement.

Un autre avantage vient de la possibilité de réaliser des spectres RMN haute Résolution de la cellulose dissoute dans ce système (réalisés avec du DMSO deutéré).

1.3 La fonctionnalisation de la cellulose :

Les dérivés de la cellulose jouent un rôle capital dans bon nombre de domaines industriels (textiles, peintures, vernis ...) ainsi que dans la recherche, notamment en chimie organique (phases stationnaires chirales pour chromatographie, bases de Schiff ...).

Les deux voies les plus répandues pour fonctionnaliser la cellulose sont l'éthérisation et l'estérification.

1.3.1 Ethérisation de la cellulose :

Parmi les systèmes décrits précédemment, certains peuvent être utilisés pour l'éthérisation de la cellulose. Par exemple, le NMNO est un solvant utilisé pour l'hydroxyméthylation, la mercaptoalylation, la cyanoéthylation et la carboxyméthylation de la cellulose. **(18, 19)**. Le système LiCl/DMAc permet de réaliser l'éthérisation de la cellulose mais il requiert l'utilisation d'un grand excès de réactifs et d'un long temps de réaction (réaction de 48h pour obtenir des DS* d'environ 1,13 pour le carboxyméthylation **(17)**).

Parmi tous les éthers de cellulose pouvant être obtenus, le carboxyméthylcellulose (CMC, est le composé le plus étudié et industriellement exploité (production mondiale de 300000 tonnes par an **(18)**).

Industriellement, la cellulose est suspendue dans un mélange isopropanol / eau (ou Ethanol / acétone), activée par de la soude en solution aqueuse. La conversion en carboxyméthylcellulose se fait grâce à l'acide monochloroacétique ou à son sel de sodium **(20, 21)**.

Le carboxyméthylcellulose est très employé dans l'industrie alimentaire comme agent texturant (E466) et dans l'industrie cosmétique comme épaississant. Commercialement, d'autres éthers de cellulose sont disponibles : méthylcellulose (le seul soluble dans l'eau), hydroxypropylméthylcellulose, éthylcellulose, benzylcellulose...

1.3.2 Estérification de la cellulose :

Depuis 25 ans, l'intérêt pour les esters de cellulose est réel ainsi qu'en atteste un très grand nombre de références bibliographiques et brevets, classifiables selon trois thèmes principaux:

- La synthèse, caractérisation et utilisation d'esters cellulosiques à longues chaînes.
- La combinaison d'esters de cellulose avec d'autres polymères dans la formulation de nouveaux matériaux plastiques,
- Les esters de celluloses comme plastiques biodégradables,

Les esters de cellulose peuvent être de différentes natures :

- Les esters inorganiques de cellulose : Ils représentent une grande famille de dérivés de la cellulose. Ces esters de cellulose peuvent être synthétisés, par exemple, par réactions de phosphorylation (22) ou de sulfatation. Les produits obtenus sont des agents potentiellement Anticoagulant ou ayant de bonnes propriétés filmogènes (ex : tosylcellulose).
- Les esters organiques de cellulose dont l'acétate de cellulose est le plus connu et qui fait l'objet principal de mon travail, il sera décrit dans le paragraphe suivant.

1.2 Acétate de cellulose :

1.2.1 Généralités :

L'acétate de cellulose obtenu par action de l'anhydride acétique sur la cellulose a été découvert en 1865 par un mulhousien, P.

Schutzenberger, qui migra à Paris après 1870 et devint le premier directeur de l'ESPCI et aussi le président de la SCF en 1885.

En faisant réagir de l'anhydride acétique sur de la cellulose de coton chauffée dans un tube fermé à 180 °C (23) Produit à grande échelle à partir du début des années 1920, il reste encore de nos jours le plus important des esters organiques de la cellulose au niveau industriel.

Dans le procédé le plus classique d'acétylation, les fibres de cellulose natives sont converties progressivement en acétate de cellulose sous l'action d'un mélange d'acide acétique glacial et d'anhydride acétique en présence d'un catalyseur tel que l'acide sulfurique ou l'acide perchlorique (24).

Une fois que le procédé d'élaboration fut amélioré.

Ce composé est utilisé dans de nombreux domaines, notamment pour la fabrication de fibres (pour les textiles comme la Célanèse® ou de filtres pour cigarettes comme la

filter tow® de Rhodia), de matières plastiques (thermoplastiques pour moulage) mais également de films (membranes de filtration)(25).

1.2.2 Elaboration et composition chimique:

Les acétates de cellulose sont des esters organiques de cellulose (**Figure 5**).

Leur structure chimique dérive de celle de la cellulose, les groupements hydroxyles ayant été substitués (en totalité ou en partie) par des groupements acétates. Dans le procédé d'estérification de la cellulose, on accorde une grande importance au degré de substitution en acétyle (noté DS qui représente aussi la teneur massique en groupements acétyle).

Celui-ci est compris entre 0 et 3.

Sa valeur est fondamentale car les propriétés physico-chimiques du polymère résultant en dépendent.

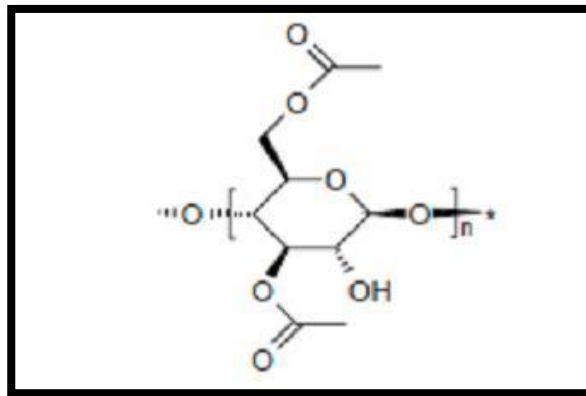


Figure 5: Composition chimique des acétates de cellulose

L'estérification de la cellulose au moyen des anhydrides d'acide est la méthode la plus répandue pour la production d'acétate de cellulose. Cette fabrication se décompose en 4 phases distinctes:

- 1) Un traitement préliminaire d'activation de la cellulose est nécessaire.

La cellulose utilisée se caractérise par une forte teneur en cellulose dite alpha (au moins 94 %, cellulose très pure, elle est classiquement issue des linters de coton) et par un DPv élevé (typiquement entre 1000 et 7000).

On préfère idéalement réaliser le séchage avec de l'acide acétique glacial et non pas par un sur séchage afin d'avoir la cellulose la plus réactive possible. La cellulose est ensuite broyée et malaxée avec de l'acide acétique pur. L'augmentation de la température et de la durée du malaxage augmente l'efficacité du prétraitement. Celui-ci permet de faire gonfler la cellulose (afin de la rendre plus réactive).

2) L'acétylation est réalisée en ajoutant l'anhydride acétique et le catalyseur acide (H_2SO_4). Il se forme alors un triacétate de cellulose. Les fibres cellulosiques se dissolvent progressivement à mesure que la réaction avance. La dissolution complète ne se produit qu'en présence d'un excès important d'anhydride acétique. Elle indique alors la fin de l'estérification. Cette réaction provoque deux phénomènes : la réaction des groupements hydroxyles de la cellulose, et la fission des chaînes cellulosiques et donc la diminution du DP de la cellulose. La température favorisant l'hydrolyse de la cellulose, il faut veiller au contrôle précis, d'autant plus que cette réaction est très exothermique.

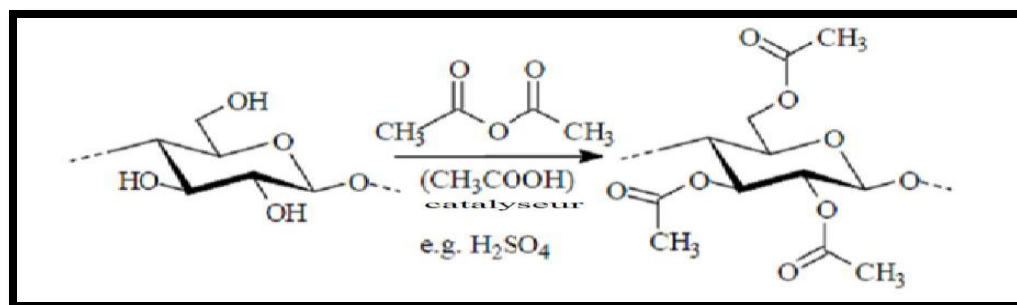


Figure 6 : Acétylation de la cellulose

3) L'hydrolyse a pour but de transformer le triacétate obtenu lors de l'acétylation en un dérivé soluble dans l'acétone. On additionne de l'eau au mélange précédent (solution d'acide acétique) pour permettre l'hydrolyse du triacétate en diacétate. Cette étape est

catalysée également par de l'acide sulfurique. Elle permet surtout de moduler le DS de dérivé synthétisé.

4) La dernière étape correspond à la **précipitation** et à la **purification**. Une fois que le DS de l'acétate a été ajusté, on précipite l'acétate cellulosique en ajoutant de l'eau à la solution et on lave à nouveau le précipité à l'eau.

Cette purification est primordiale afin d'éliminer les traces d'agents chimiques et de recycler l'acide acétique.

Après la synthèse et la purification de l'acétate de cellulose on passe à l'exploitation de dérivé cellulosique dans l'application en techniques membranaire, le chapitre suivant sera consacré pour la description des différentes techniques utilisé dans le domaine de séparation via les membranes(26).

1.2.3 les applications de l'acétate de cellulose:

Utilisé initialement comme vernis pour avion durant la Première Guerre mondiale, l'acétate de cellulose reflète les évolutions du siècle dernier.

Il était au coeur du développement des nouveaux textiles synthétiques et fut l'un des premiers plastiques d'origine végétale.

Ce matériau trouve aujourd'hui une multitude d'applications :

des cartes de jeux de haute qualité aux rubans adhésifs, sans oublier les nouvelles applications dans le domaine des filtres haute technologie.

Même si environ 70% de la production annuelle d'acétate de cellulose sont consacrés aux filtres à cigarettes, l'industrie transforme aujourd'hui plus d'un million de tonnes, toutes applications confondues.

Partie II : Micro encapsulation

II.1 L'encapsulation :

II.1.1 Définition :

La micro encapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active (27). La terminologie microcapsules sous entend des entités dont le diamètre est compris entre 1 et 1000 μm . Le terme nanocapsule est réservé aux capsules dont la taille est inférieure au micron. La substance encapsulée peut se présenter sous la forme de fines particules de solide divisé, d'un liquide, ou encore d'un composé gazeux (28).

La microcapsule permet de préserver la substance encapsulée sous la forme d'un état finement divisé, et de la relarguer dans les conditions souhaitées. L'encapsulation d'un liquide permet de convertir ce liquide sous la forme d'une poudre solide, tout en préservant sa réactivité à l'état liquide. De ce fait, l'encapsulation facilite la manipulation de réactifs liquides, et permet de ne démarrer la réaction chimique visée que quand la capsule est rompue (29). Le fait d'encapsuler une substance peut permettre d'augmenter sa densité, ou encore de la diminuer en incluant de l'air dans la capsule. Un solide dense peut ainsi être converti en un produit flottant dans l'eau.

II.1.2 Classification des microparticules:

Le type de particules obtenues par micro encapsulation dépend des propriétés physicochimiques de la matière active et de la matière enrobante, de leur composition et de la technique utilisée. Les microparticules peuvent se présenter sous différentes structures dont les deux plus simples sont la structure réservoir (microcapsule) et la structure matricielle (microsphère) (30).

II.1.2.a Les systèmes réservoirs (microcapsules) :

Les microparticules sont des structures réservoirs, sphériques, à paroi polymère et comportant un cœur hydrophile ou lipophile. Le principe actif est généralement dissous dans le cœur mais peut également être adsorbé à la surface des nanoparticules. **(Figure 1 -a)**

II.1.2.b Les systèmes matriciels (microsphères):

Les microsphères sont des structures matricielles de forme sphérique constituées d'un réseau polymère. Le principe actif est soit dispersé dans le réseau polymère durant la formation des microsphères, soit adsorbé à la surface de ces particules après préparation par l'intermédiaire de liaisons de type hydrophobes, électrostatiques ou covalentes. **(Figure1-b).**

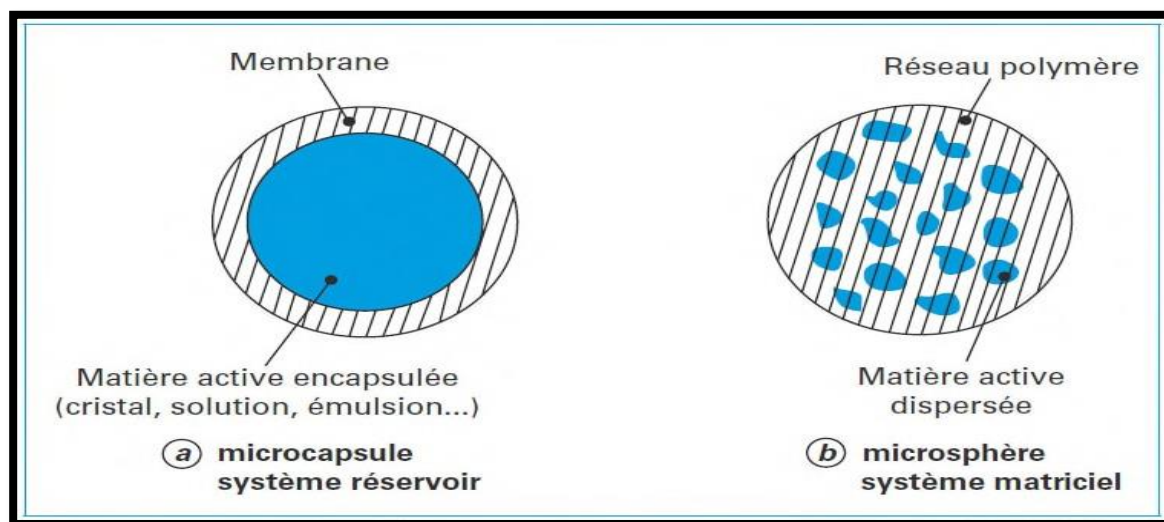


Figure 7: Schéma représentant la morphologie des microparticules

II.1.3 Techniques d'encapsulation

II.1. 3.1 Introduction

Les différentes méthodes de micro encapsulation peuvent être classifiées selon différents critères (31).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 micro encapsulation: on distingue les procédés physico-chimiques des procédés chimiques et mécaniques (31-32).

II.1.4 Les différents procédés de micro encapsulation :

.III.4.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 (33).

Le procédé d'encapsulation par coacervation est décrit dans la **Figure 8**

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**) (34, 35).

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 (**étape3**).

Elles coalescent pour former un film solide continu. Puis, il y a un renforcement de la membrane par réticulation du polymère (**étape4**) (34).

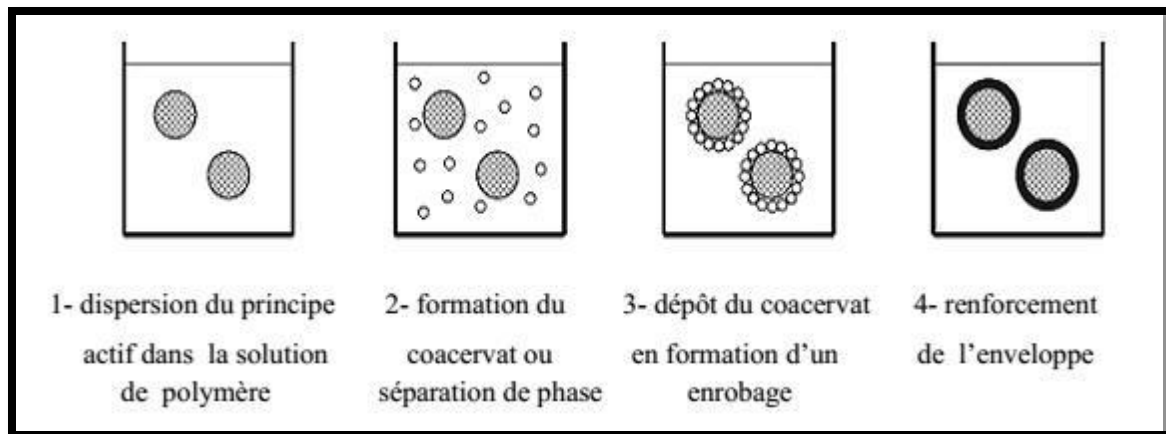


Figure 8 : Principe de l'encapsulation par coacervation

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

A l'échelle du laboratoire, la technique la plus fréquemment utilisée est la « Méthode du béccher » illustrée en (figure 9).

A titre d'exemple, principales étapes de Préparation des microparticules utilisant des émulsions eau dans huile dans eau (E/H/E) sont montrées :

Le principe actif est soit dispersé ou dissout dans la phase aqueuse interne ; Cette dernière est émulsifiée dans une solution organique du polymère qui formera la matrice. La formation des gouttelettes est causée par une agitation mécanique, par exemple au moyen d'une pàle ; L'émulsion eau dans huile (E/H) ainsi obtenue est ensuite dispersée dans une phase aqueuse externe résultant en une émulsion eau dans huile dans eau (E/H/E).

A nouveau, la formation des gouttelettes est provoquée par agitation mécanique, par exemple au moyen d'une pàle. Dès que le solvant organique entre en contact avec la phase aqueuse externe, il diffuse dans cette dernière.

Le solvant organique migre ensuite à la surface de l'émulsion E/H/E par convection et diffusion, où il s'évapore. Ainsi, la concentration du solvant organique dans la phase intermédiaire diminue au cours du temps. Au dessous d'une concentration critique donnée, le polymère commence à précipiter, encapsulant alors le principe actif.

Les microparticules sont formées. Etant donné que les étapes (1)-(3) sont toutes réalisées dans des bécchers, cette méthode de préparation est appelée la « Méthode du béccher ».

Par la suite, les microparticules sont séparées par filtration et séchées. Le principe de ce

Procédé est représenté sur la (figure 9).

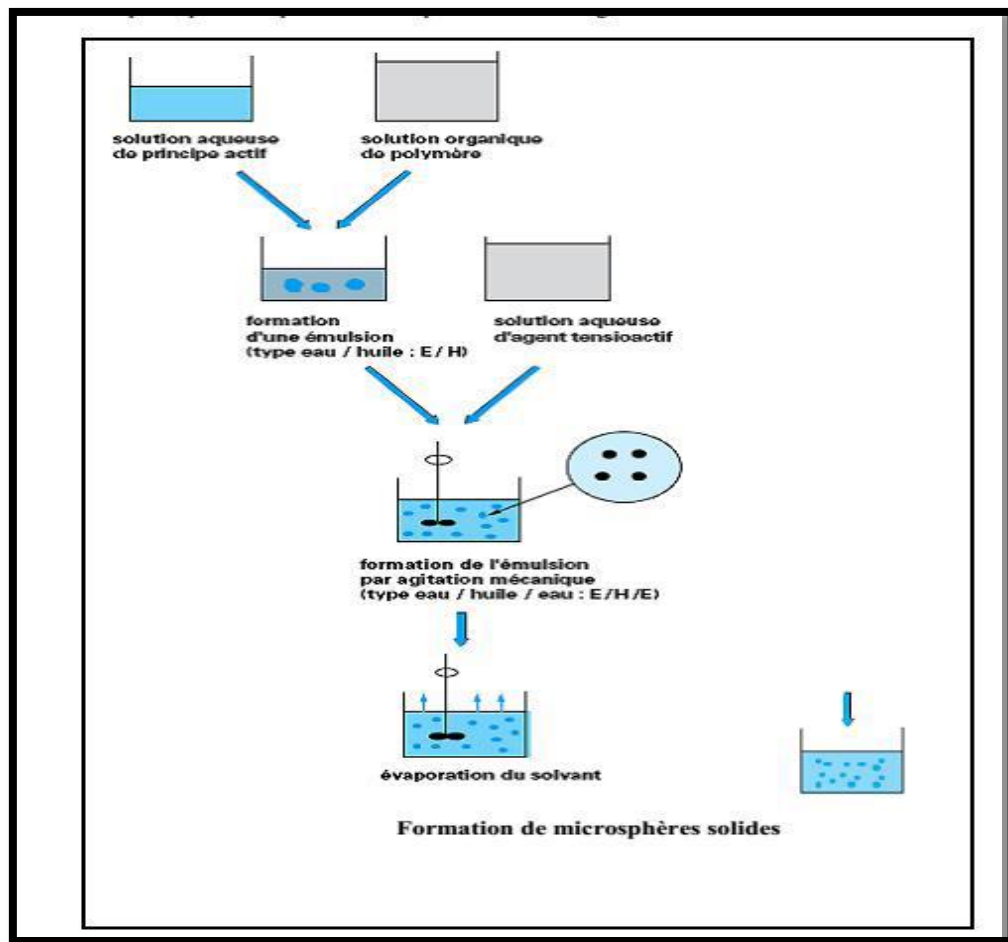


Figure 9: Procédé de microencapsulation par évaporation de solvant à partir d'une émulsion E/H.

➤ Technique par fusion à chaud du polymère :

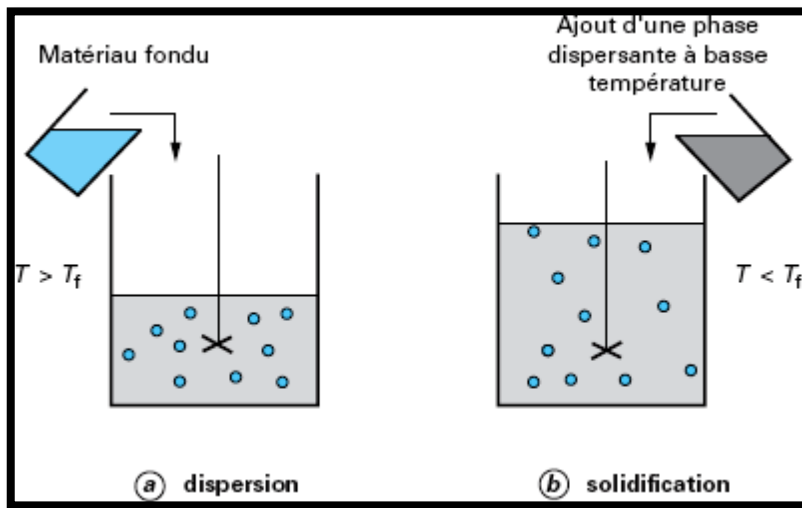


Figure 10: Préparation des microsphères par fusion à chaud

II.1.4.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 (36, 37).

➤ 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 11**).

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 (**38**).

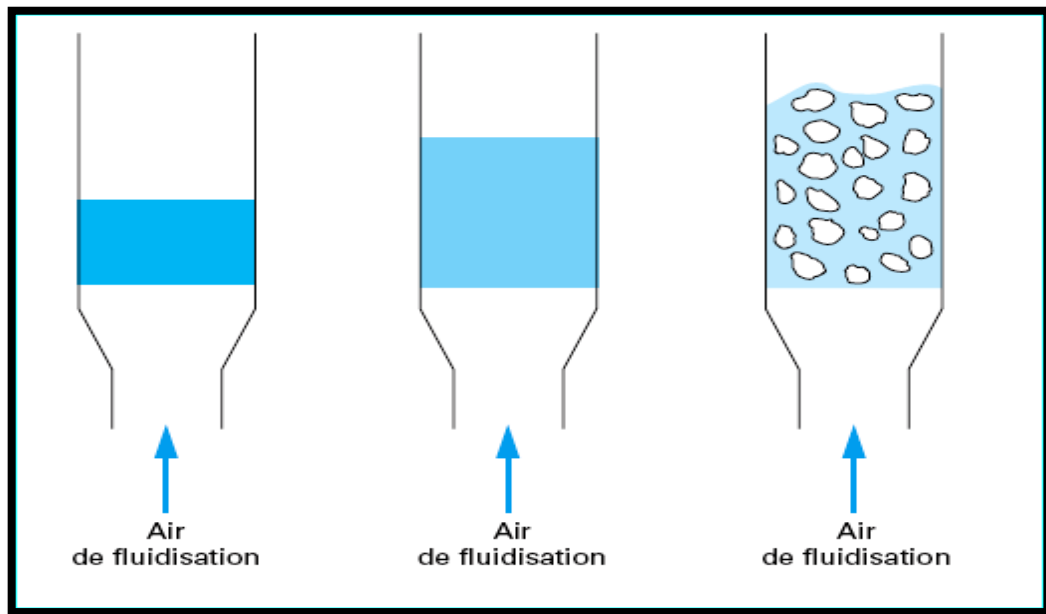


Figure 11 : Différentes étapes de la fluidisation

II.1.4.c) Procédés chimiques :

➤ **Encapsulation par polymérisation interfaciale :**

La caractéristique de cette technique est le fait que l'enveloppe est formée à la surface d'une goutte ou particule par polymérisation de monomères. Elle repose sur le concept suivant deux monomères réactifs X et Y présents séparément dans deux phases non miscibles vont réagir à l'interface pour donner un polymère qui constituera la paroi de la capsule (**39**).

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 12**) (40) (41).

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 (42).

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 24 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) (43).

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).

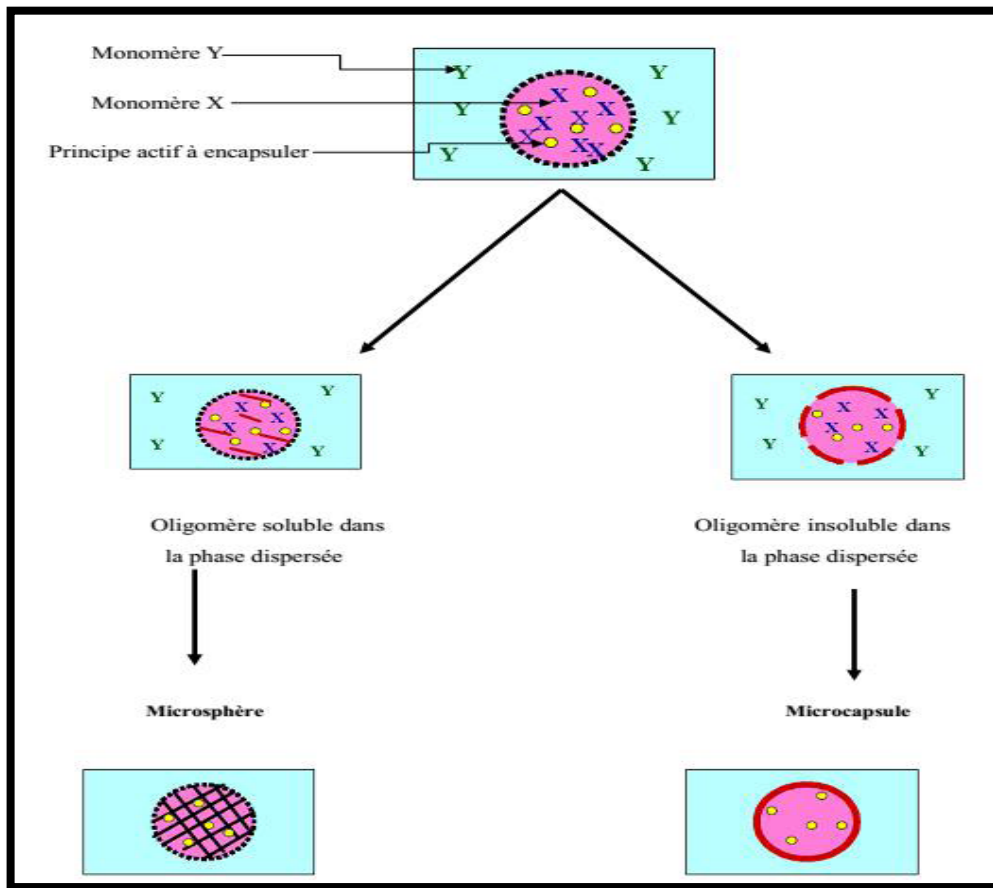


Figure 12 : Mécanisme de formation des microparticules par polymérisation interfaciale

II.1.5 Techniques de caractérisation des microcapsules

II.1.5.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 (44).

II.1.5.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(44).

II.1.5.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 (44)

II.1.5.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) (44).

II.1.5.e) Quantification :

Il s'agit du dosage, des profils de libération et d'autres analyses ; à

Savoir :

- Chromatographie / Spectrométrie ;
- Spectroscopies, RMN ;
- Conductivité, pH (44).

II.1.6 Application de la micro encapsulation :

La micro encapsulation a été développée et appliquée dans des domaines variés

(39)(45):

➤ Domaine pharmaceutique:

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

➤ Domaine cosmétique :

Des microcapsules ont déjà été intégrées dans différentes Crèmes, des shampoings, ou des gels, afin de prolonger la stabilité chimique et microbiologique du principe actif.

➤ Domaine agro-alimentaire:

La micro encapsulation est principalement utilisée pour des Additifs alimentaires, tels que des arômes, des édulcorants, des colorants,... etc.

➤ ***Domaine textile:***

Les microcapsules peuvent rendre des textiles hydratants, Désinfectants, parfumés,... etc. Récemment des tissus contenant des microcapsules à base de paraffine permettent d'ajuster automatiquement la température en fonction de la chaleur du corps humain

III. 1 Antioxydants :

III. 1. 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 (46).

III. 1. 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 (46).

III. 1. 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(47).

III. 1. 4 Classification des antioxydants :

- ✓ Les antioxygènes sont classés dans trois catégories différentes (47).
- ✓ Les antioxydants synthétiques.
- ✓ Les substances synergiques.
- ✓ Les antioxydants d'origine végétale.

III. 1.4.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 présent 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(46).

III. 1. 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(47).

III. 1. 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(46).

➤ **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). Ont signalé qu'une molécule de tocophérol peut protéger 103 à 106 molécules d'AGPI(46).

➤ **Exemple de tocophérol :**

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.1.5 Evaluation de la capacité antioxydant par des tests in vitro :

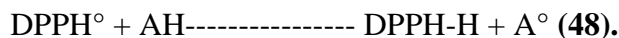
Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par deux mécanismes :

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.1.5.a) Test DPPH :

Cette méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH $^{\circ}$. 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.2 L'activité antibiotique :

III. 2.1 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, engendre des maladies. Les maladies infectieuses causées par les bactéries pathogènes représentent un problème de santé publique repose 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(49), antivirale(50,51).

III.2 .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.

- **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.2 .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. 2.3.1 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.2.3.2 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 (48,49) 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. 3.4.1 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 oeuvre.

Les différents protocoles peuvent ainsi être classés : Selon le milieu dans lequel se fait la diffusion du composé, soit liquide, solide ou gazeux (52,53).

Selon la nature du contact avec le germe : diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsionnant (57,55).

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(56).

Il s'agit d'une méthode de diffusion en milieu gélosé coulé et solidifié en boîte de Pétri.

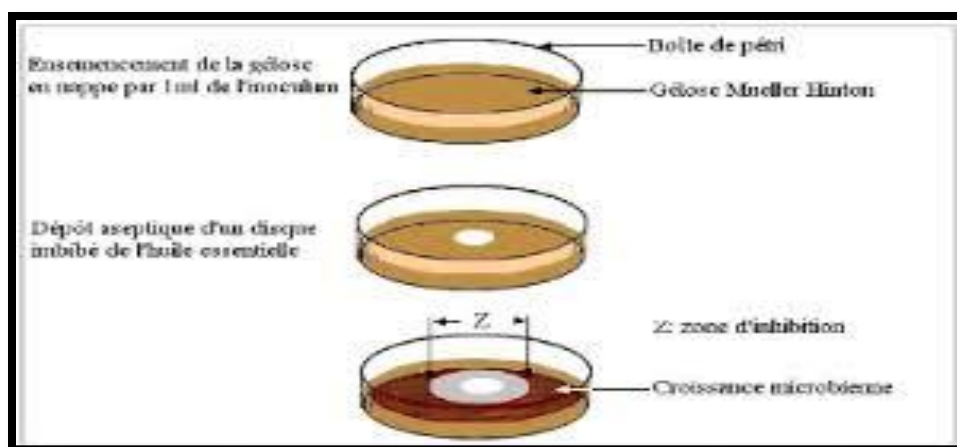


Figure 13 : Illustration de la méthode de diffusion sur boîte Pétri

(ZAIKI, 1988)

La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différents produits à tester.

Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque antibiotique diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration.

Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration suffisante en antibiotique pour inhiber leur croissance.

On observe, ainsi, autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition.

Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique.

Plus il est petit, plus elle est résistante (57).

Une variation de cette technique a été rapportée par Tharib et al. (58), 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. (59), Lis- Balchin et al. (60), Burt et Reinders (61), Faleiro et al. (62), Kunle et al.(63), Cette technique permet une bonne estimation du pouvoir antimicrobien, surtout pour les Produits ayant une bonne diffusion dans le milieu solide.

Chapitre I:

References bibliographiques

- (1) D. Alfred, R. Bertoniere, R. M. Brown, H. Chanzy Gray, K. Hattori, W. Glasse Cellulose, Encyclopedia Of Polymer Science And Technology, Wiley. 2003.
- (2) Perez, S. And Mazeau, K., "Conformations, Structures, And Morphologies Of Celluloses", In Polysaccharides (2nd Edition), Ed. Severian, D. 2005, Marcel Dekker, Inc, New York. P.,41-68
- (3) Habibi, Y.; Chanzy, H.; Vignon, M. R. Tempo-Mediated Surface Oxidation Of Cellulose Whiskers. Cellulose **2006**, 13, 679–687.
- (4) A. Payen Mémoire Sur La Composition Du Tissu Propre Des Plantes Et Du Ligneux, Compt. Rend. 7,1052, 1838.
- (5) J Leseq., Chromatographie Par Perméation De Gel/ Chromatographie Par Exclusion Stérique, P1465, Techniques De L'ingénieur, Paris, 1994.
- (6) J.S Lin, M.Y Tang, Et J.F. Fellers, The Structures Of Cellulose. Acs Symposium Series. 340:233-254, 1987.
- (7) Valentine, L., Sorption Of Moisture By Polymers. I. Effect Of Crystallinity. Journal Of Polymer Science. 27: 313-333 (19585).
- (8) Scallan, A.M., The Accommodation Of Water Within Pulp Fibers. Fibre-Water Interaction Papermaking, Transformation Symposium. 1: 9-29 (1978).
- (9) Robertson, A.A., Interactions Of Liquids With Cellulose. Tappi. 53: 1331-1339 (1970).
- (10) Robertson, A.A., Cellulose-Liquid Interactions. Pulp & Paper Magazine Of Canada. 65: T171-T177 (1964).
- (11) Zeronian, S.H., "Intercrystalline Swelling Of Cellulose", In Cellulose Chemistry And Its Application, Ed. Nevell, T.P. And Zeronian, S.H. 1985, Horwood, Chichester. P. 138-158.
- (12) Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U. And Wagenknecht, W., "Comprehensive Cellulose Chemistry, Volume 1: Fundamentals And Analytical Methods". 1998, Wiley, New York
- (13) Zeronian, S.H., "Intracrystalline Swelling Of Cellulose", In Cellulose Chemistry And Its

Application, Ed. Nevell, T.P. And Zeronian, S.H. 1985, Horwood, Chichester. P. 159-180.

(14) Philipp, B., Organic Solvents For Cellulose. Polymer News. 6: 170-175 (1990).

(15) Johnson, D.C., "Solvents For Cellulose", In Cellulose Chemistry And Its Application, Ed. Nevell, T.P. And Zeronian, S.H. 1985, Horwood, Chichester. P. 181-201

(16) Egal, M., Budtova, T. And Navard, P., The Dissolution Of Microcrystalline Cellulose In Sodium Hydroxide-Urea Aqueous Solutions. Cellulose. 15: 361-370 (2008).

(17) Heinze, T., "Chemical Functionalization Of Cellulose", In Polysaccharides (2nd Edition), Ed. Severian, D. 2005, Marcel Dekker, Inc, New York. P. 551-590.

(18) Heinze, T., Liebert, T., Klufers, P. And Meister, F., Carboxymethylation Of Cellulose In Unconventional Media. Cellulose. 6: 153-165 (1999).

(19) Johnson, D.L., Compounds Dissolved In Cyclic Amine Oxides, Us Patent 3447939, 1966

(20) Olaru, N., Olaru, L., Stoleriu, A. And Timpu, D., Carboxymethyl Cellulose Synthesis In Organic Media Containing Ethanol And/Or Acetone. Journal Of Applied Polymer Science. 67: 481-486 (1998).

(21) Brandt, L., Cellulose Ethers. Industrial Polymers Handbook. 3: 1569-1613 (2001).

(22) P.L.Granja, L. Pouységu, , Petraud, M., De Jéso, B., Baquey, C., Barbosa J.Appl.Polym. Sci., 82, 3341-3353. 2001.

(23) K. Balsler, Hope L., T. Eicher, M. Wandel, Hj. Astheimer, H. Steinmeir, Cellulose Esters, Ullmann's Encyclopedia Of Industrial Chemistry, Editions Wiley. 2000.

(24) G.A. Serad, Fibers, Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, Wiley Interscience, New York, 3, 200-226, 1985,

(25) Groupe Français D'étude Et D'application Des Polymères (Gfp), Initiation A La Chimie Et A La Physico-Chimie Macromoléculaire Vol 13 : Les Polymères Naturels: Structures, Modifications, Applications, Edition Strasbourg. 2000.

(26) R. E.Lapointe, Précis De Chimie De La Cellulose, 2nd Edition, Ccdmd. 2000

- (27) Richard, J., Benoit, J.P., 2000, Microencapsulation, Techniques De L'ingénieur, J 2210, 1–20.
- (28) **Boh.B**, Sumiga.B, 2008. Microencapsulation Technology And Its Applications In Building Construction Materials, Rmz Materials And Geoenvironment, Vol.
- (29) Finch, C.A., Bodmeier, R., 2005, Microencapsulation, Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co. Kгаа, Weinheim 10.1002/14356007.A16_575.
- (30) Benoit, J.-P. Et Richard, J. Microencapsulation. Les Techniques De L'ingénieur. 10 03 2000, J2210
- (31) Joël Richard, Jean-Pierre Benoît, Microencapsulation, Technique D'ingénieur, J 2210
- (32) A. Nesterenko, (: Étude Et Fonctionnalisation De Protéines Végétales En Vue De Leur Application En Microencapsulation. Thèse De Doctorat, Université De Toulouse2012).
- (33) Bojana Boh, Bostjan Sumiga, Microencapsulation Technology And Its Applications In Building Construction Materials, Rmz – Materials And Geoenvironment, Vol. 55, No. 3, 329-344, 2008.
- (34) 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..
- (35) 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
- (36) Joël Richard, Jean-Pierre Benoît, Microencapsulation, Technique D'ingénieur, J 2210
- (37) P.Buri ; F.Puisieux ; E.Doelker : Formes Pharmaceutiques Nouvelles Edition : Paris , Technique Et Documentation ; 1985
- (38) 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
- (39) Alfonso, R. G., Remington: The Science Of Practice Of Pharmacy, Vol-2, 890-891.
- (40) Richard, J., Benoit, J.P., 2000, Microencapsulation, Techniques De L'ingénieur, J 2210,

- (41) Seyed Ali Hashemi, Mojgan Zandi, Encapsulation Process In Synthesizing Polyurea Microcapsules Containing Pesticide, Iranian Polymer Journal , Vol 10; N° 4, 2001
- (42) Charman S. A. Et Charman W. N , 2003, Oral Modified-Release Delivery System Dans Modified-Release Drug Delivery Technology, Drugs And The Pharmaceutical Science, Volume 126, Eds. Rathbone M.J, Hadgraft J, Roberts M. S, New York, Pp.1-10
- (43) 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
- (44) C. Arroudj, H.Benameur: Etude D'un Procédé De Microencapsulation Par Emulsification D'un Principe Actif Anti-Inflammatoire Et Caractérisation Biopharmaceutique. Mémoire De Master.Université A.Mira. Béjaia(2006)
- (45) Rama Dubey, T.C. Shami And K.U. Bhasker Rao, Microencapsulation Technology And Applications, Defence Science Journal, Vol. 59, No. 1, 82-95, 2009.
- (46) Z.Hellal, Contribution A L'étude Des Propriétés Antibactériennes Et Antioxydantes De Certaines Huiles Essentielles Extraites Des Citrus. Application Sur La Sardine (Sardina Pilchardus). Mémoire De Magister, Universite Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou(2011).
- (47) J. R.Klimenberg; S. E. Goldfinger; J. E. Seegmiller, Ann. Intern. Med. 62, 639, 1965.
- (48) J. J. Marr; R. L. Berens, Mol. Biochem.Parasitol,6, 323, 1983,.
- (49) O. Moukha-Chafiq, M.L .Taha., H. B. Lazrek , J.J. Vasseur, C. Pannecouque,M. Witvrouw, E.D.Clercq. Il Farmaco.57, 27, 2002.
- (50) J. Metzner, E. Lippmann, F.G. Weber, G. Westphal; Pharmazie, 36, 388, 1981.
- (51) L.E. Seitz, W.J. Suling, R.C. Reynolds; J. Med. Chem., 45, 5604,2002.
- (52) L.L .Zaika., J. Food Safety, 9, 97., 1998.
- (53) M.D. Smith, P.L. Navilliat, J.Microbiol.Meth, 28, 21, 1997.
- (54) C.M. Mann, J.L.Markham., J.Appl. Microbiol, 84, 538, 1998.
- (55) M. Lahlou, Phytotherap. Research, 18, 435, 2004.

- (56) M.F. Belier- Maurel, Rivista Italia, 58, 283,2000.
- (57) J.L. Fauchère, L. Avril, « Bactériologie Générale Et Médicale », Ellipses, 2002.
- (58) S.M.Tharib., S.O. Gnan. G.B.A. Veitch, J.Food. Prot., 48, 681, 1998.
- (59) S.G .Deans. G.Ritchie, Int. J.Food Microbiol, 5, 162, 1987.
- (60) Lis- Balchin.M, Hart. S.L., Phytotherap. Research, 14, 623, 2000.
- (61) Burt. S.A, Reinders. R.D, Lett. Appl. Microbiol., 36, 162, 2003.
- (62) M.L. Faleiro ,M. G.Miguel. , Lett. Appl. Microbiol., 36, 35, 2003.
- (63) K Unle. O., Okogun. J., Egamana. E., Emojevwe. E., Shok M. J. Phytomed,; 10, 59; 2003.



Chapitre II:
Etude expérimentale

Partie I : Synthèses et Caractérisations

L'objectif de notre travail est l'étude de la cinétique de libération prolongée de deux principes actifs l'un est un antioxydant la quercétine, est l'autre est un antibiotique l'érythromycine, on a envisagé de les dispersés dans une matrice polymérique qu'on va préparer a partir d'un produit naturel le coton.

Ce travail expérimentale comprend deux parties ; la première partie est consacrée à la synthèse des microparticules à base de gélatine et de triacetate de cellulose par évaporation de solvant et qui seront ensuite caractérisées par différentes techniques d'analyses : IR, UV-visible et DRX ; et l'étude cinétique de libération des principes actif dans deux milieux physiologiques reconstitués pH=1.2 et pH= 7.4. La deuxième partie comporte l'étude de l'activité antioxydante et antibiotique des microparticules afin de tester le procédé utilisé .

Dans cette partie on va présenter :

- La préparation de polymère CTA
- La préparation des microparticules à base de CTA.
- Les caractérisations des microparticules par différentes méthodes d'analyses.
- L'étude cinétique de la libération des principes actifs.
- Etude de l'activité biologique

1.1. Produits et Matériels utilisées :

1.1.1 les produits :

- Dichlorométhane est obtenue de PS : PANREAC SINTESIS)
- Gélatine
- Sodium tetra-Borate 10 hydrate (Borax) est provient du Panreac (Barcelone-Espagne
- HCl (36%) est un produit de Stinnes Chemicals
- NaCl, origine : Acros Organics
- Acide Sulfurique (96-98 %) est provient du Organics
- Acide Acétique (99-100 %) provient du Biochem Chemopharma
- Anhydride Acétique est provient du Merck

I.1.2 Dispositif expérimental :

- ✓ Montage à reflux (dans la synthèse de Triacétate de cellulose)
- ✓ La phase organique est émulsifiée avec la phase aqueuse dans un réacteur cylindrique en Verre (volume 250ml) sous agitation mécanique avec une turbine d'agitation de 4 pales (longueur de la pale: 50 mm, largeur de la pale: 8 mm, type: Heidolph RZP1).

I.1.3 Identification des produits :

Tableau 2: Propriétés physiques et chimiques de l'acide éthanoïque, acide sulfurique et l'anhydride éthanoïque

<i>Espèce chimique</i>	<i>Anhydride Ethanoïque</i>	<i>Acide éthanoïque</i>	<i>acide sulfurique 95%</i>
<i>Masse molaire</i>	<i>102,09 g.mol</i>	<i>60,04 g.mol</i>	<i>98,07 g.mol</i>
<i>T fusion (°C)</i>	<i>- 73</i>	<i>16</i>	<i>-32</i>
<i>T ébullition (°C)</i>	<i>140</i>	<i>117-118</i>	<i>337(décomposition)</i>
<i>Masse volumique p</i>	<i>1,08 g.cm-3</i>	<i>1,04 g.cm-3</i>	<i>1,8302 g.cm-3</i>
<i>Caractéristique(s) des vapeurs et précautions</i>	<i>lacrymogène, ses vapeurs sont irritantes</i>	<i>Corrosif, ses vapeurs sont irritantes.</i>	<i>Corrosif et toxique, ses vapeurs sont irritantes.</i>
<i>Solubilité dans l'eau</i>	<i>Grande ((cette Réaction Exothermique peut être violente)</i>	<i>Grande</i>	<i>Grande (sa réaction Avec l'eau est très exothermique).</i>

1.1.3.a) 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

1.1.3.b) 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 quercétol.

Les études in vitro et in vivo ont montré que c'était un excellent antioxydant. La structure chimique de Quercétine .

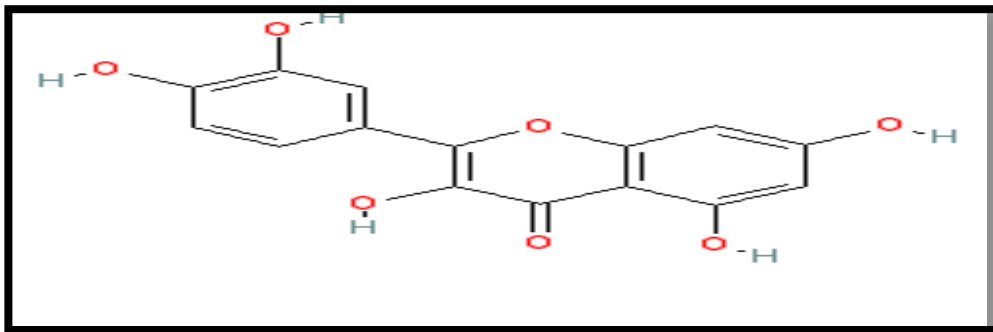


Figure 14 : La structure chimique de la Quercétine

Tableau 4 : Propriétés physiques et chimiques de quercitrine

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

I.1.3.c) L'érythromycine

L'érythromycine est produite par une souche de *Streptomyce serythreus* 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

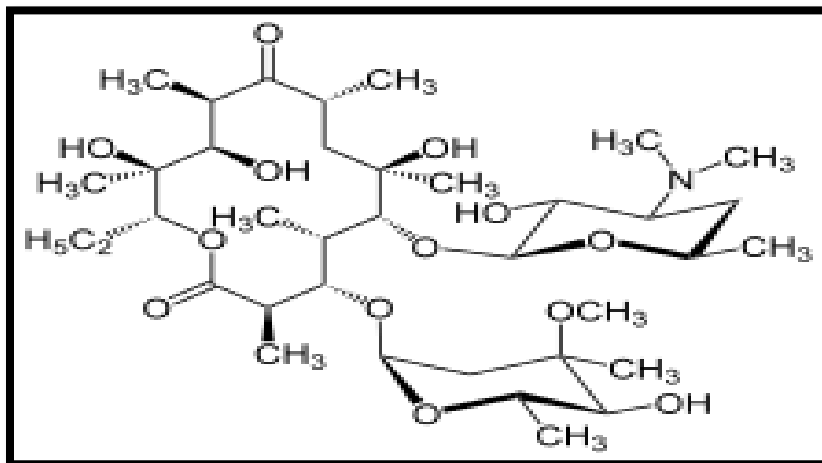


Figure 15: La structure chimique de l'érythromycine

Tableau 5 : Propriétés physiques et chimiques d'ER.

Nom	L'érythromycine
Apparence	<i>Poudre blanche ou légèrement jaune ou cristaux incolores ou légèrement jaunes</i>
Description des propriétés Physiques	<i>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</i>
pKa (constantededissociation)	8,8
Biodisponibilité	100%
Demi-vie (t1/2)	1,5 heure
Métabolisme	Hépatique

1.2.Synthèse chimique de Triacétate de la cellulose (CTA)

1.2.1.Mode opératoire

Dans un ballon de 250 ml on introduit 1.5g de coton (ou la cellulose le polymère) mis en petites boules, on ajoute 12 ml d'acide acétique pur et deux gouttes d'acide sulfurique à 95 %. Le mélange est porté à reflux entre 60-70 °C pendant 30 min, on dégage le bain marie et on refroidit avec de l'eau, on ajoute après 12 ml d'anhydride acétique introduit par le haut de réfrigérant par petite quantité, le mélange est chauffé de nouveau à T =70 °C jusqu'à ce que le coton ait disparu totalement (environ 15 min). Le milieu est refroidit et on ajoute 5 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique à 20 % en volume. Chauffé à nouveau entre 60 et 70°C (pendant 10 min).

Après un refroidissement complet le contenu du ballon est versé dans un bécher de 400 ml, 100 ml d'eau distillée chaude a été ajoutée lentement en agitant, le triacétate de cellulose se précipité, on filtre sur büchner puis on lave le produit avec de l'eau l'opération de lavage est refaite plusieurs fois jusqu'à la neutralisation des eaux de lavage (pH prélevé a l'aide de papier pH : Le pH au début : 3; le pH à la fin de lavage est 6.5), le produit finale est séché dans l'étuve à 60 °C.

Le même mode opératoire est refais avec la cellulose.

1.3.Préparation des microparticules à base de Triacétate de cellulose et Gélatine

1.3.1. Mode opératoire

1,5 g de gélatine est dissoute dans 100 mL d'eau distillée sous une forte agitation pendant quelques minutes, une phase organique est préparée par dissolution de 1.5g de polymère (CTA) et (0,3g - 0.5g) de principe actif (la 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) après agitation, on met en marche l'agitateur à une vitesse de (1300-1500 tr/mn) sous une température de 40°C.

La phase dispersée est ensuite ajoutée goutte à goutte. Après une durée de 3 heures 30min, on a procédé à une filtration afin de récupérer, les microparticules qui sont lavées avec l'eau distillé trois fois.



Figure 16 : Dispositif expérimental de la synthèse des microparticules

Les microparticules obtenues sont ensuite observées sous microscope à balayage électronique.

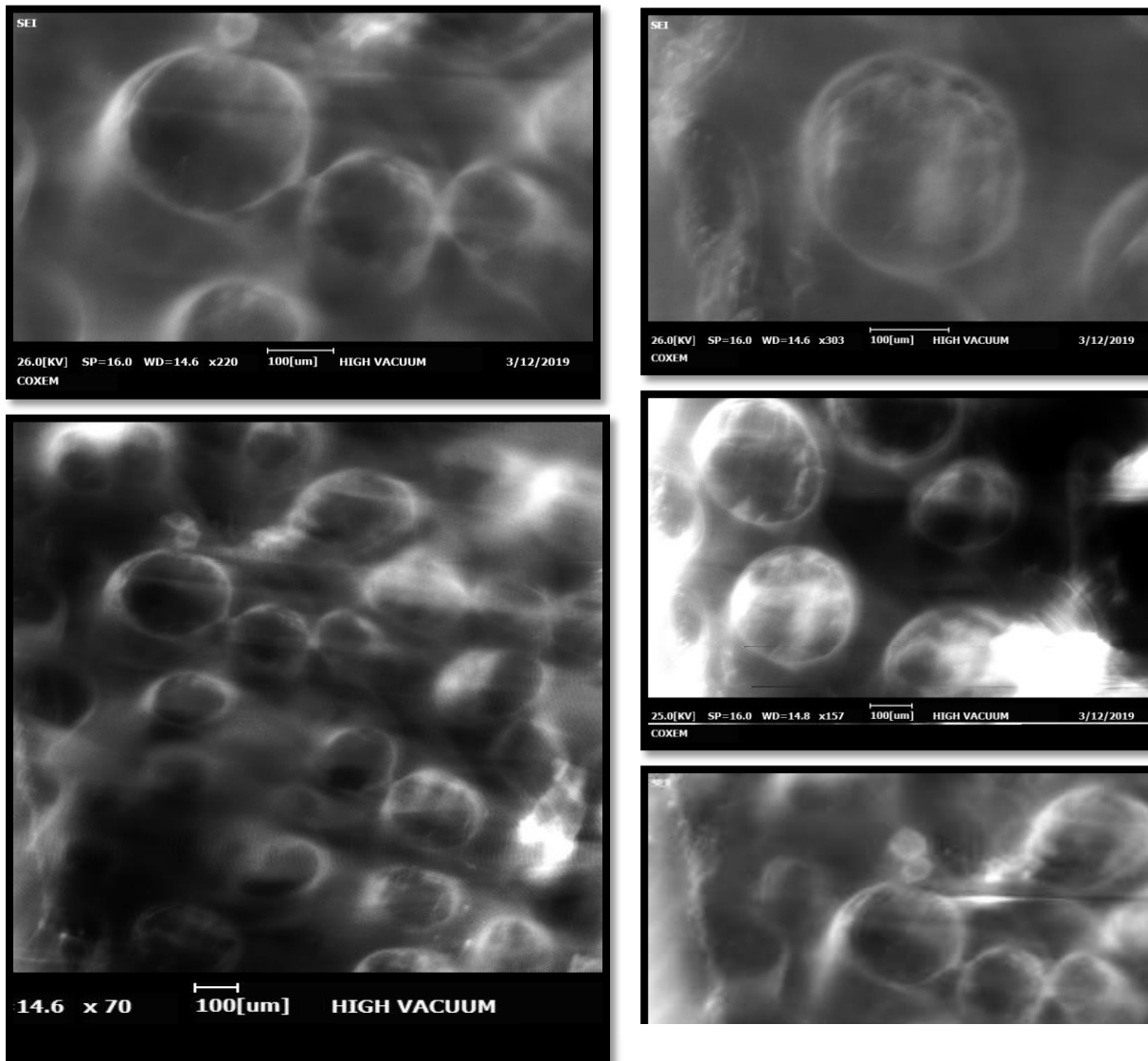


Figure 17 : photos MPs des microparticules

On remarque d'après la **figure17** que les microparticules sont de forme irrégulière ovale et non sphérique, avec une surface rougeuse

I. 3.2. Etude cinétique :

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 maximale pour les deux pH par UV-Vis:

Afin de déterminer les valeurs de longueur d'onde, un balayage est réalisé dans les deux pH (1,2 et 7, 4) en préparant des solutions diluées des deux principes actif à l'aide d un spectrophotometre .

Les longueurs d'ondes sont comme suit : exprimées en nm.

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

	pH de milieu	$\lambda_{max}(nm)$
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 (figures 18.19)

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

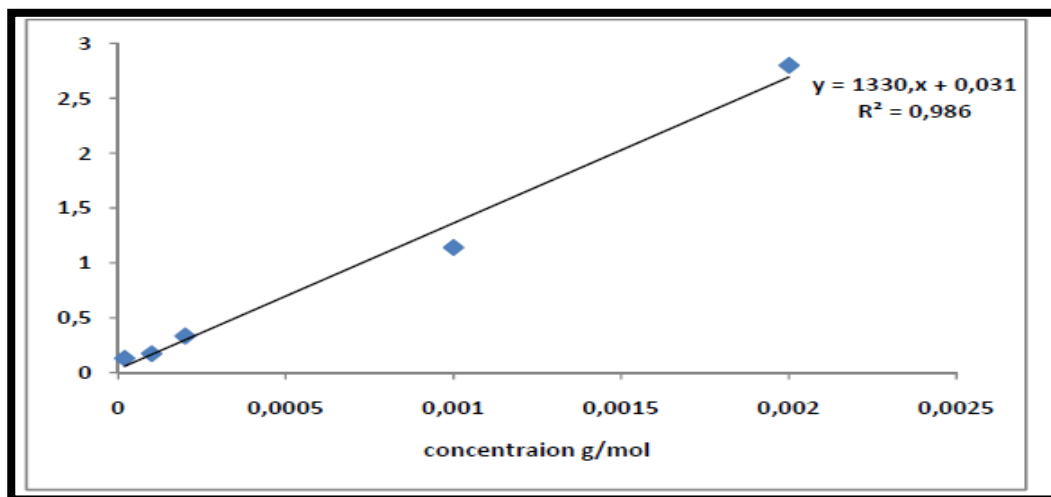


Figure 18 : Courbe d’étalonnage de QR à pH=1.2 (374nm)

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

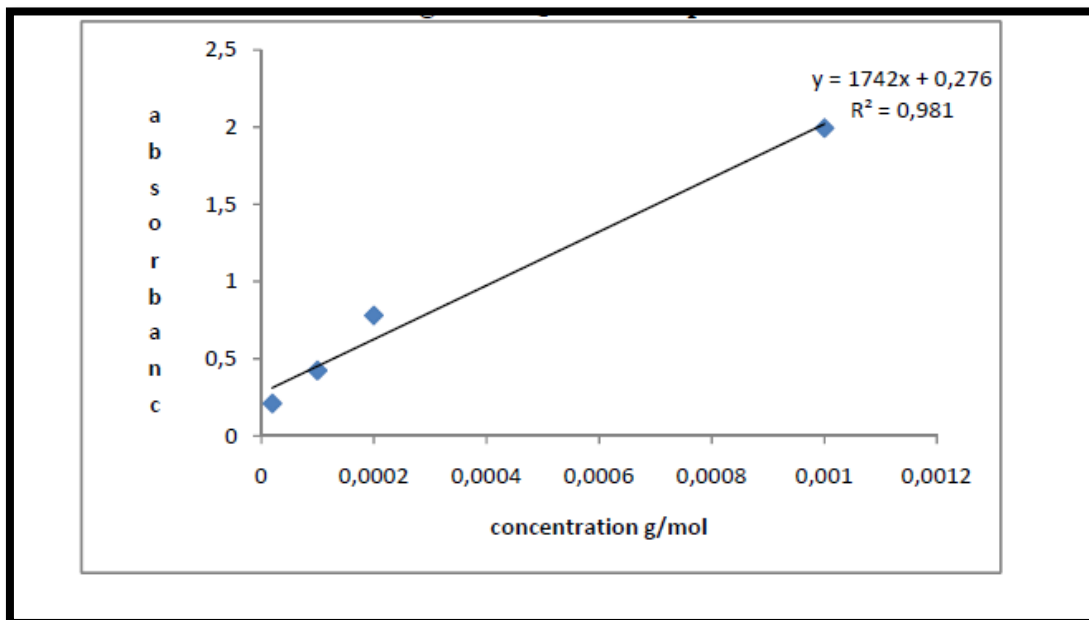


Figure 19: Courbe d'étalonnage de QR à pH=7.4 (386nm).

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

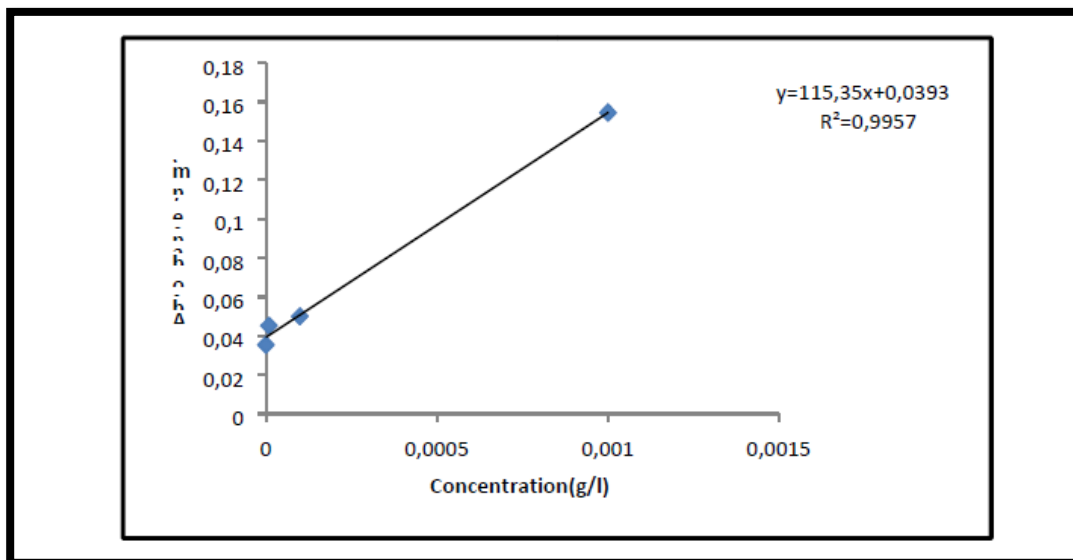


Figure 20: Courbe d'étalonnage de l'érythromycine à pH=1.2 (286nm).

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

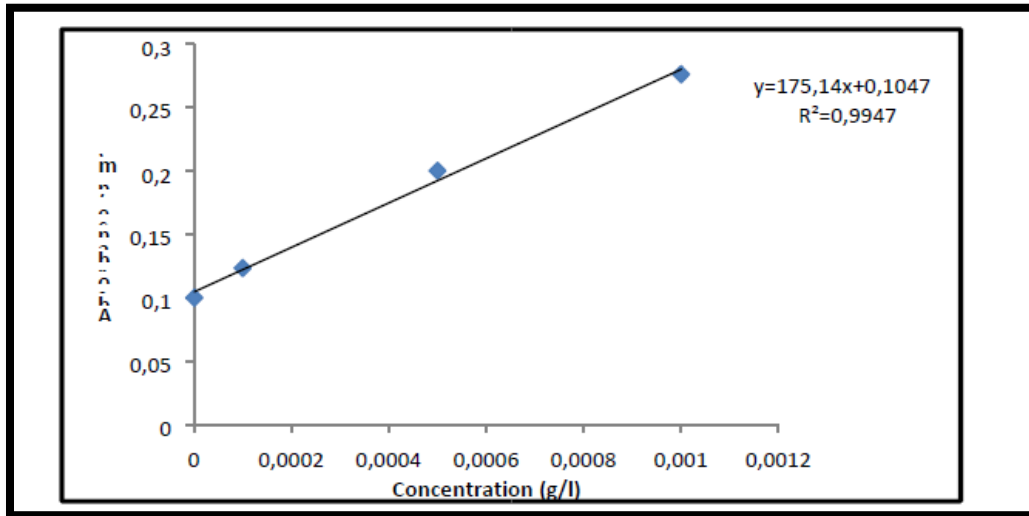


Figure 21: Courbe d'étalonnage d'ER à pH=7.4 (268nm).

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

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 ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$).
- C : la concentration en mol/L de la solution.
- L : la longueur de la cellule en quartz (1cm).

Les valeurs des coefficients d'absorption spécifiques trouvées sont données dans les tableaux suivants :

Tableau 8 : Valeurs de ε du ER à pH=1,2 et pH=7,4 à 37°C.

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

Tableau 9: Valeurs de ε du QR pH=1,2 et pH=7,4 à 37°C

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

I.4.Caractérisations du CTA :

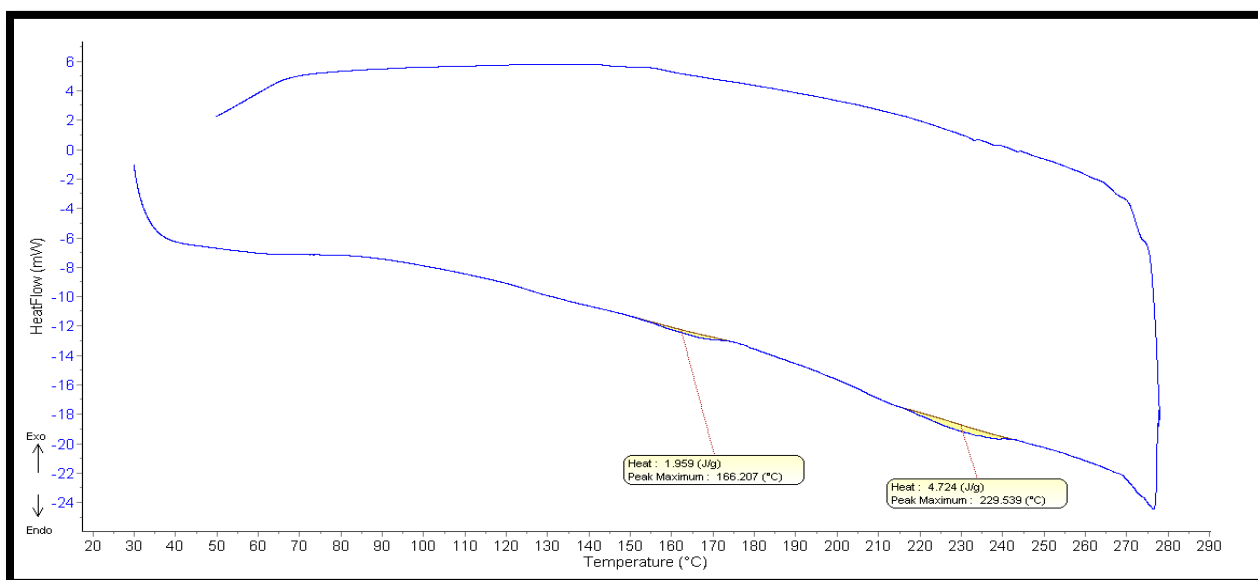


Figure 22 : Thermogramme DSCDE CTA

I.4.1.Analyse calorimétrique différentielle DSC:

La calorimétrie permet de mesurer des variations de flux de chaleur entre une capsule contenant l'échantillon et une capsule vide, servant de référence.

Cette technique permet donc de mesurer les variations de capacité calorifique associées aux changements d'état de l'échantillon lorsqu'il est soumis à un cycle de température. Les analyses sont faites sur un appareil DSC-7 PERKIN-ELMER.

Les échantillons sont soumis au cycle de température suivant : le produit est pesé (environ 15 mg) puis il est introduit dans une capsule DSC.

Le comportement thermique du CTA synthétisé a fait l'objet d'une analyse enthalpique différentiel réalisée entre -20°C et 290°C avec une vitesse de chauffage de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ sous un flux d'argon balaie l'enceinte de la DSC pour éviter toute oxydation.

Les résultats représentés sur **la figure 22** ont fait apparaître les phénomènes thermiques suivants :

Une température de transition vitreuse T_g enregistrée à 166.7°C . Sur la lumière de ces résultats on peut dire que notre polymère présente une structure amorphe, nous noterons la présence des impuretés ou la cellulose qui ne s'est pas transformé en triacétate de cellulose.

1.4.2. Résonance Magnétique Nucleaire:

L'acétate de cellulose a été caractérisé à température ambiante par le spectromètre Bruker fonctionnant à 300 MHz avec le CDCl_3 comme solvant et le TMS comme étalon interne à ppm.

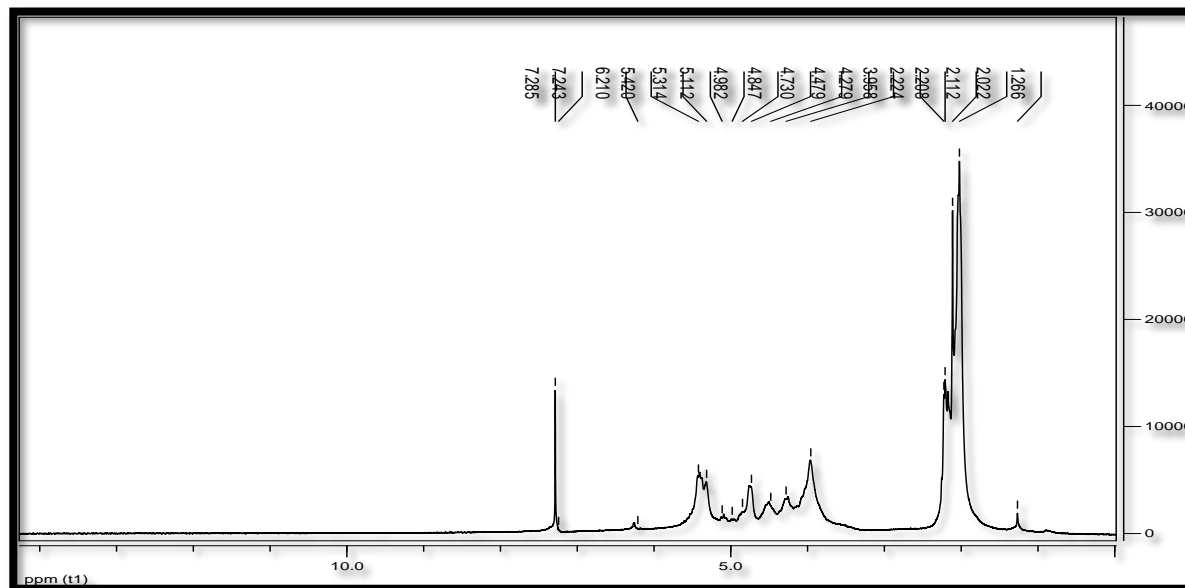


Figure 23 : spectre RMN¹H CTA CDCl₃ (7.28 CDCl₃)

L'analyse par RMN H (figure 23...) confirme la structure du triacétate de cellulose. En effet nous observons dans le spectre la présence des pics caractérisant les protons Méthylique du groupement acétate dans les différentes positions (C2, C3, C6) Et qui apparaitront (2,02- 2,11- 2,20) ppm respectivement.

Nous remarquons aussi la disparition totale du pic à 3 ppm correspondant au proton (OH), initialement présent dans la structure de la cellulose.

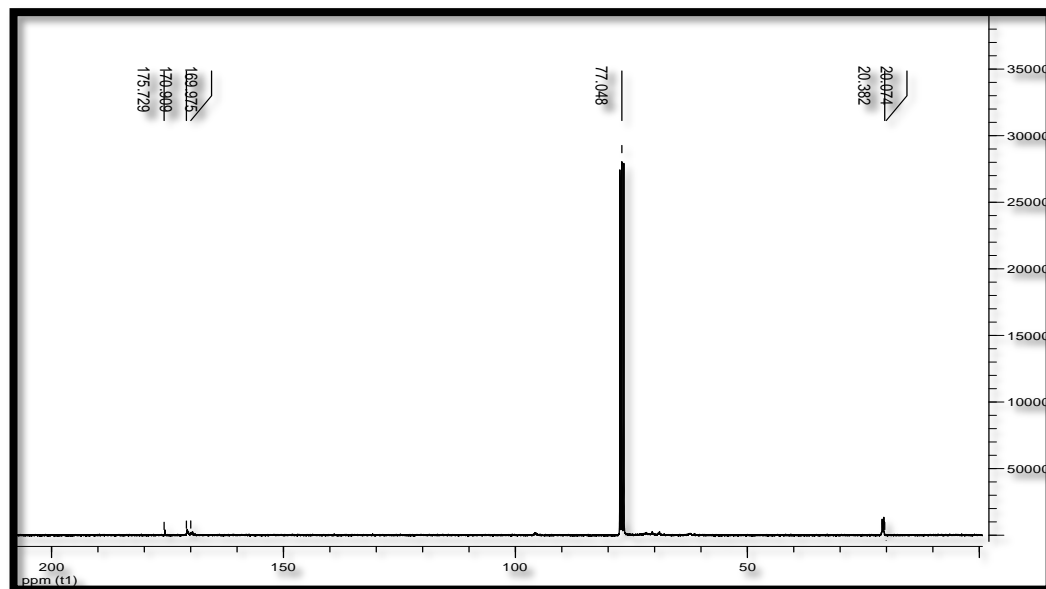


Figure 24: spectre $RMN^{13}C$ CTA $CDCl_3$ (77.048 $CDCl_3$)

➤ **RMN C13:**

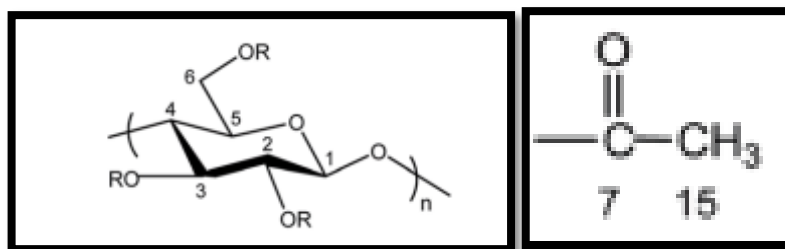


Figure 25: RMN C1

L'ester cellulosique préparé a été caractérisé par RMN13C (figure 24). En effet nous constatons la présence de pic à (20-21) ppm caractérisant le C15 correspondant au groupement acétyle.

Les pics caractérisant les carbones C-6, C-2, 3,5, C-4 et C-1 apparaitront à (62, -97) ppm.

Les pics les plus importants correspondants au groupe ester carbonyle C-7 apparaitront à 169.97, 170.90, 175.72 ppm correspondant au carbone carbonyle aux C-2, C-3 et C-6. Le spectre est en faveur de la structure du triacétate de cellulose (CTA).

I.4.3. Etude de spectroscopie infra rouge des microparticules de CTA :

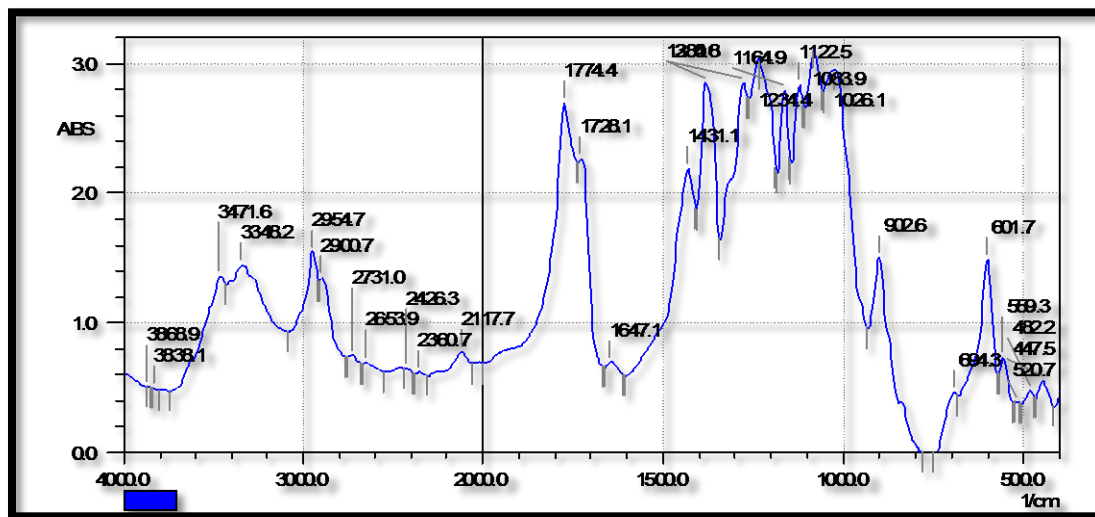


Figure 26: Spectre infra rouge des microparticules du Triacétate de cellulose

I.5. 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 tracés sur *la figure 28*

I.5.1. Mode opératoire :

L'étude des cinétiques de la libération de PA est réalisée avec une masse de 0,1g de microsphères dans 100mL 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 croît au cours du temps. On mesure l'absorbance par UV-Vis.

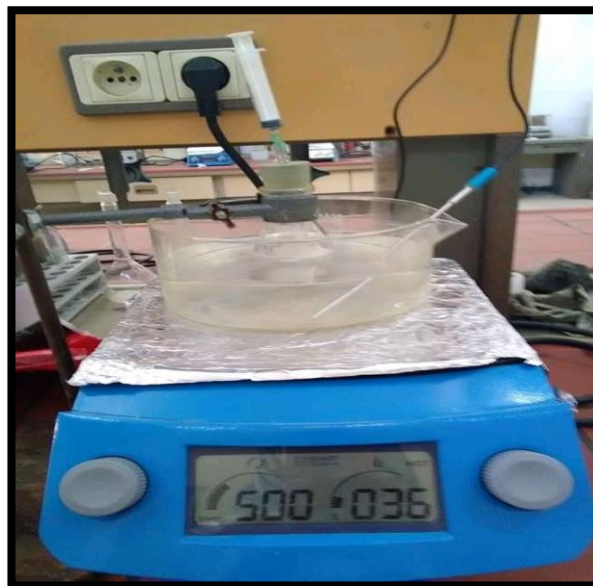


Figure 27: le dispositif expérimental de la libération du PA

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 :

- ✓ $mt = D.O .Vd MM / \epsilon.Vf$
- ✓ **D.O** : Densité Optique lue à chaque prélèvement
- ✓ **ϵ** : Coefficient d'extinction moléculaire
- ✓ **Vd** : Volume de dilution du prélèvement (10 cm³) ;
- ✓ **Vf** : Volume du flacon (réacteur) (50 mL) se change au court du temps.
- ✓ **M.M** : Masse Molaire du principe actif.

$$\%Pa = mt / mi * 100$$

Résultats de la libération des PA dans les pH :

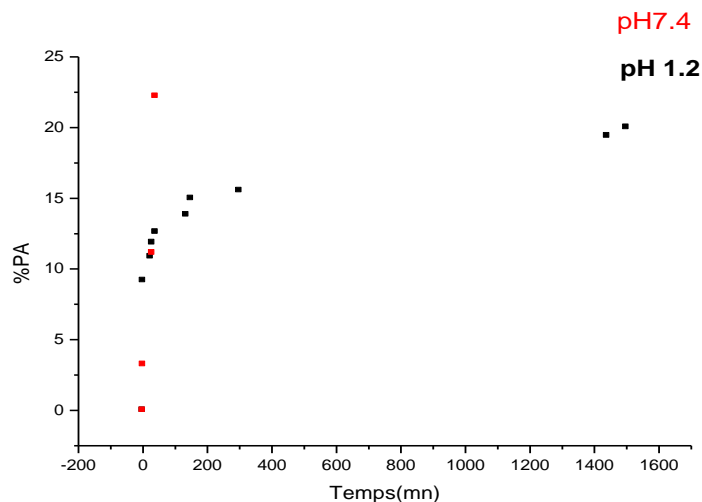


Figure 28: Le taux de libération de QR en fonction du temps.

Selon **la figure 28**, la libération de QR est préférée à pH 7,4 on note un taux de libération approchant les 23%, le même profil est observé dans le pH=1.2.

Le taux de libération du PA augmente en fonction du temps puis il atteint un palier à 23% D'après ces résultats ER est libérée plus rapidement dans le pH=7.4

Les résultats obtenus rejoignent ceux de l'année dernière (1) ou l'érythromycines est libérée à partir de la polycaprolactone, la seule différence demeure dans le taux de libération qui va être directement liés à la structure, la morphologie et le poids moléculaire du polymère utilisé.

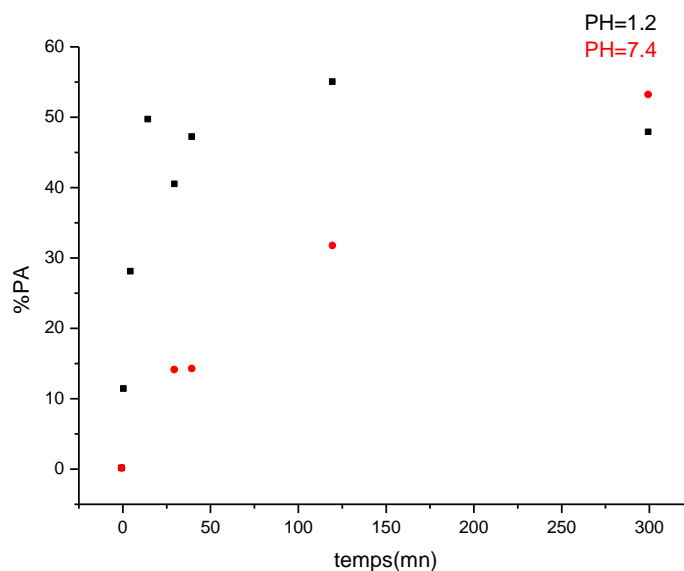


Figure 29 : Le taux de libération d'ER en fonction du temps

Selon la figure, la libération de ER est préférée à pH 7,4 on note un taux de libération approchant les 55%, 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 55% Nous avons voulu tester la libération de la quercetine a partir des microparticules qui ont été exposées a une source UV nous avons obtenus les résultats de **la figure 29**.

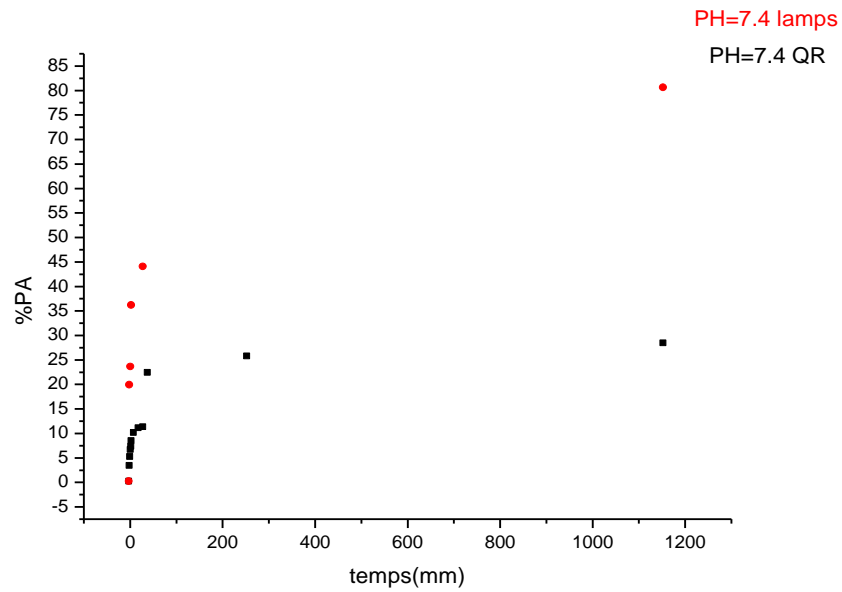


Figure 30 : Le taux de libération de QR en fonction du temps a partir des microparticules soumises a une source UV

D'après les résultats obtenus nous pouvons conclure, que la dégradation du CTA après 20 jours d'exposition a cette source de lumière, est visible puisque le taux de libération

de PA a augmenté considérablement, le polymère retenait le PA par des liaisons hydrogène et seule le CTA se trouvant à la surface des microparticules est libéré dans le pH 7.4, ceci aussi est relation avec le poids moléculaire du CTA qui va garder le PA grâce aux enchevêtrements des chaînes.

I.6 Analyse de l'incorporation du PA par Infra rouge :

I.6.1 Spectrophotomètre infrarouge à transformé de Fourier

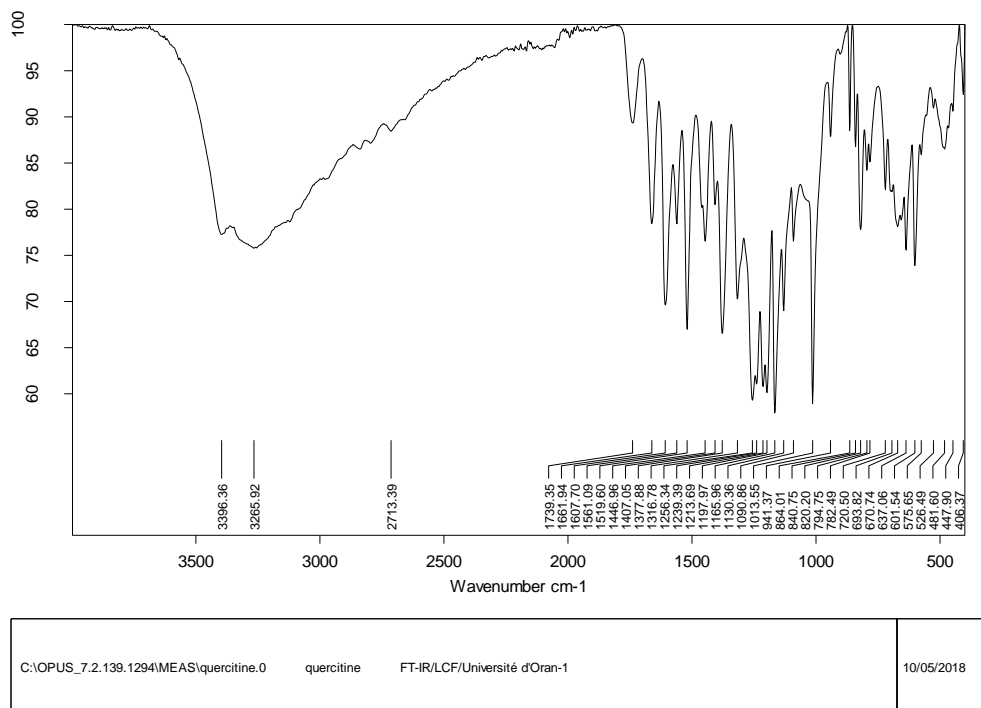


Figure 31: Spectre Infrarouge de QR.

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

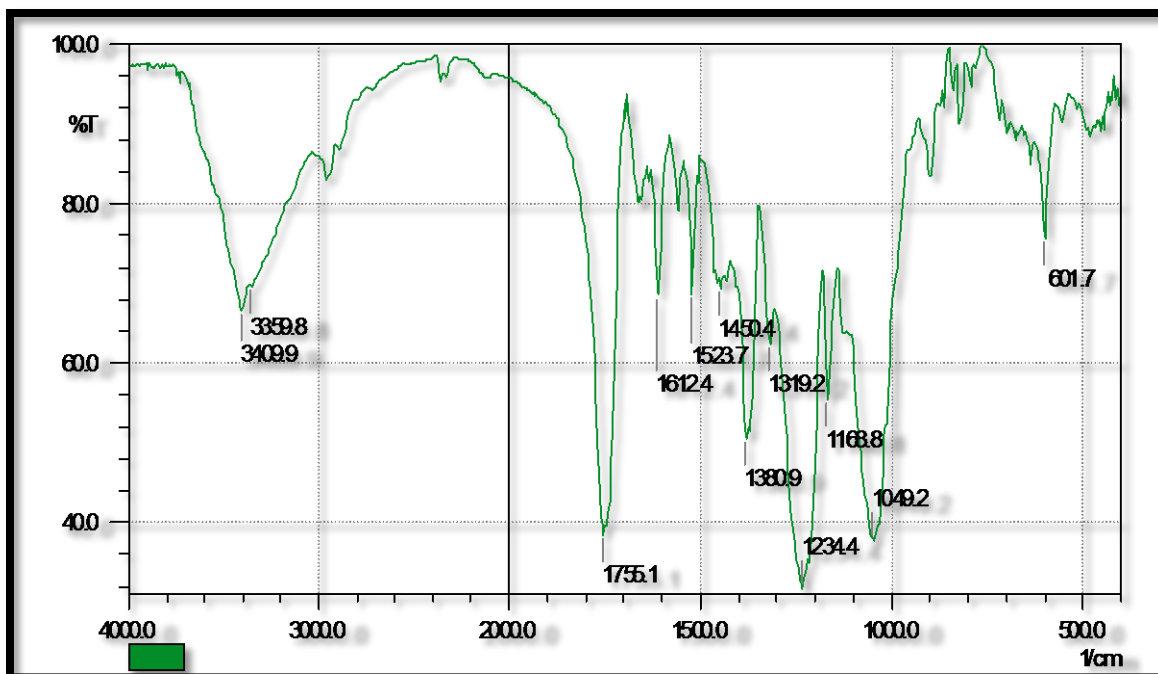


Figure 32 : Spectre Infrarouge de MPs de QR

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

Le spectre IR des microparticules établi est comparé aux spectres du polymère matrice **figure 33** utilisé et de principe actif (QR). Les résultats montrent que le spectre des microparticules n'est que la somme des deux spectres FTIR du CTA et QR.

Les principales bandes d'absorption d'QR qui apparaissent nettement dans le spectre des microparticules ainsi la présence de la bande caractéristique C-O-C présente dans le spectre infra rouge des Ms du CTA et qui n'apparaît pas dans le spectre du CTA polymère.

I.6.2 Le spectre infra rouge d CTA :

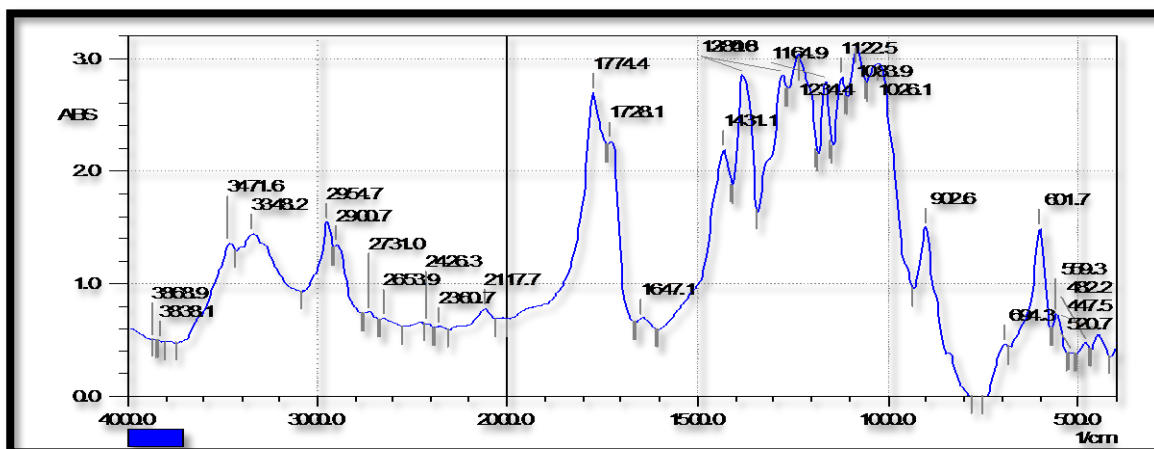


Figure33 : Spectre Infrarouge de CTA

I. 6. 3. Diffraction des rayons X (DRX) :

Caractérisations par DRX des microparticules CTA chargés en quercitrine :

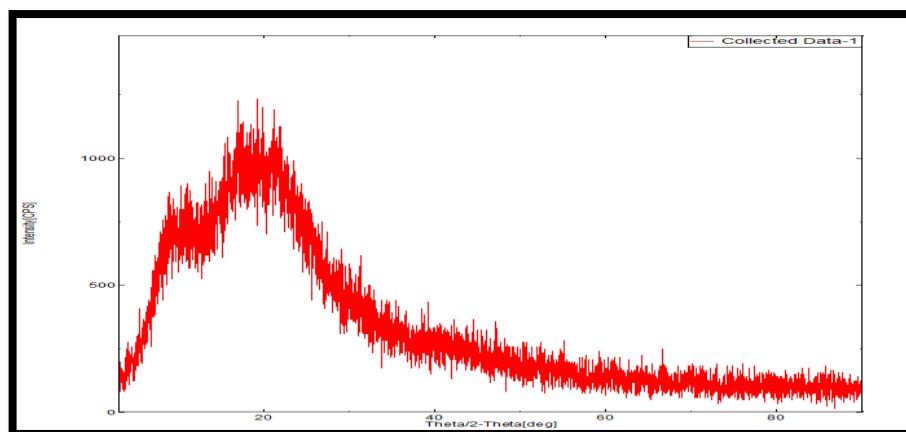


Figure 34: diffractogramme des microparticules de triacétate de cellulose

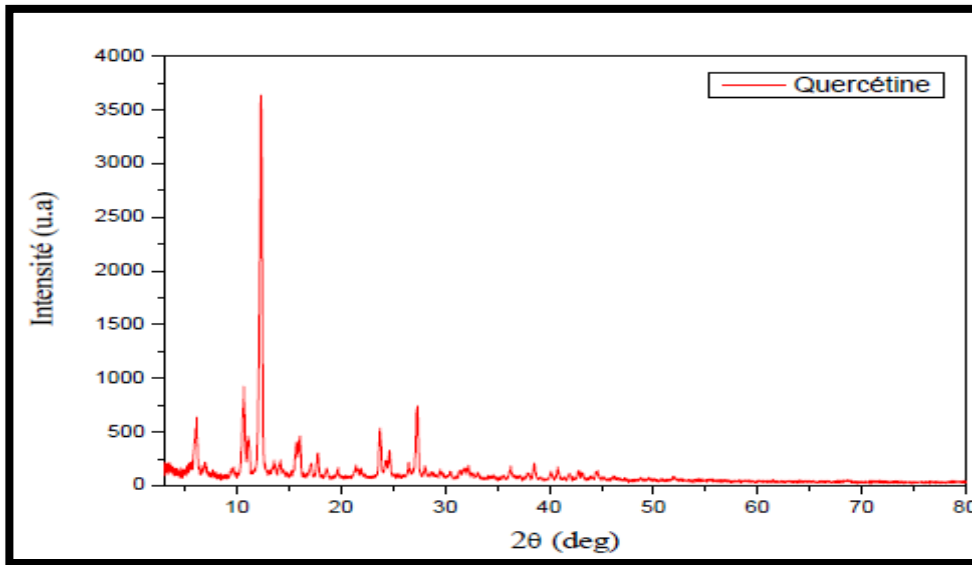


Figure 35: Le diffractogramme QR

Le diffractogramme des microparticules du CTA présente une bande large ; ce qui atteste que notre polymère à la base présente que les propriétés d'un matériau amorphe. Es corps cristallins peuvent être considérés comme des assemblages de plans réticulaires plus ou moins denses, présentant les caractéristiques de l'état cristallin, c'est-à-dire un arrangement périodique, ordonné et dans des plans réticulaires tridimensionnels des atomes constitutifs. Les atomes s'organisent donc en plans réticulaires plus ou moins denses qui sont désignés par leurs coordonnées (h, k, l) dans un système de repérage de l'espace.

$d_{h,k,l}$ n' ont pas pu être déterminés puisque ,on n' a pas trouvé les informations nécessaires pour pouvoir détecter les plans réticulaires de notre polymère même après une recherche bibliographique .

La DRX des microparticules du CTA peut nous montré ou le principe actif est dispersé dans la matrice, on n'a pas noté l'apparition du pic le plus intense dans le diffractogramme de la quercetine $2\theta=13^\circ$ en comparaisant avec le diffractogramme et CTA on ne retrouve pas la raie a cette angle $2\theta=13^\circ$ ce qui nous amène à dire que le microparticule principe actif est dispersé dans la partie amorphe.

Partie II : L'activité antioxydants et antibiotique :

La deuxième partie comporte l'étude de l'activité antibiotique, et l'activité antioxydante des microparticules sur différents souches bactériennes.

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). (2)

II. 1. 2.Évaluation du pouvoir antioxydante :

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 (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) (DPPH). (2)

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).(2).

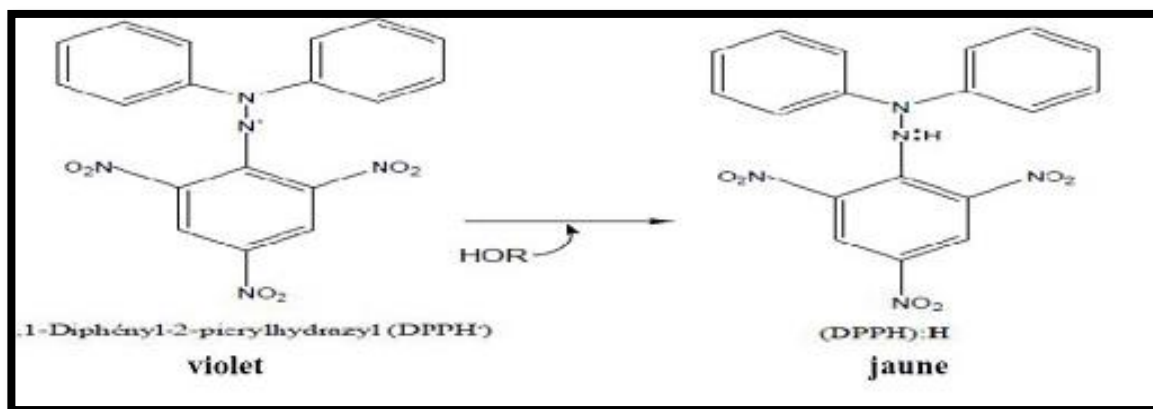


Figure 36: Piégeage du radical libre DPPH●

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. 1.4.1 préparation 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 d'opérateur :

0.1g de microparticule a base de QR a été broyée dans 50ml de solution PH=7.4 ensuite 1ml de cette solution QR de concentration 5.034ug/ml a été ajoutée à 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.

Le même protocole a été utilisé pour les prélèvements cinétiques.



Figure 37: Les résultats de la capacité d'inhibition de DPPH.

D'après les résultats obtenus dans la **figure 37** l'activité antioxydante a été relevée dans les prélèvements cinétiques de la libération de la QR dans le pH=7.4, la couleur de la solution des prélèvements a viré de la couleur violette à la couleur jaune ce qui veut dire que l'activité antioxydante du DPPH n'est pas inhibée même si la quercétine se trouve encapsulée dans les microparticules du CTA et libérée dans le milieu elle garde son effet vis-à-vis de cette réaction.

II. 2. L'activité antibiotique :

II. 2.1. 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 concentrations (mg/l) et relativement lentement (heures).

Les antibiotiques peuvent être d'origine naturelle, ou hémisynthétique ou purement synthétique. (3)

II. 2.2. 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. 2.2.a) Procédure de diffusion en gélose :(4) (5)

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 (5).

II.2. 3. Mode opératoire :

II.2. 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, 08 la souche bacillus subtilis la même valeur pour DO =0.081 Escherichia coli et la souche Staphylococcus aureus leur DO= 0.083 ($\lambda=600\text{nm}$)



Figure 38: Les 3 souches bactériennes ; a : *E. coli* et c : *S. aureus* .b : *Bacillus subtilis*

Le tableau ci-dessous représente l'activité antibactérienne du solvant utilisé pour solubiliser CTA, pH de la cinétique, et le témoin chargé en érythromycine afin de le comparer avec les prélèvements cinétiques.

LA SOUCHE	<i>STAPH</i>	<i>E.COLI</i>	<i>S.BACILLIS</i>
DMSO ^d	/	0.3	0.2
pH ^d	/	/	0.1
DISQUE ER ^d	1	1.2	1.4

d : diametre de la zone claire(cm)

II.3 Activité antibactérienne du CTA



Figure 39: résultats après 24H des 3 souches bactériennes

II.3.1.L'activité bactérienne du CTA :

Tableau 10 : Diamètre de la zone claire du CTA

Les souches	<i>STAPH</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.bacillus</i>
D (cm)	1	1.5	3

D'après l'étude de l'activité antibactérienne effectuée on constate que le CTA présente une activité vis-à-vis des trois souches puisque après 24h d'incubation on retrouve zone claire pour les trois bactéries (**figure 39**).

Le tableau (10) représente, le diamètre de la zone claire, la plus importante correspond à celui du bacillus .S et la moins importante et celle du *STAPH*.

II.4.1 La méthode en milieu liquide

1ml du prélèvement de la cinétique de libération de l'érythromycine du pH 7.4 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 24 heures .Le témoin (standard) a été préparé sous les mêmes conditions dans le milieu pH=7.4

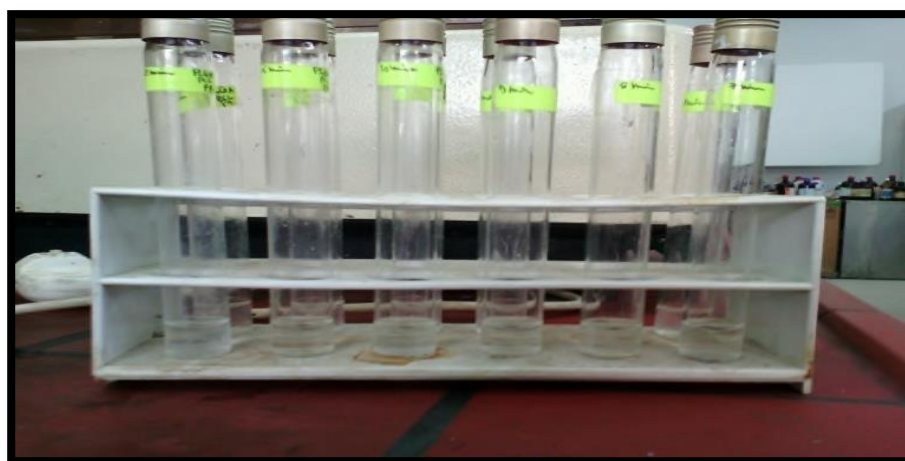


Figure 40 : La méthode de dilution en milieu liquide.

II.4.2. 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 L du prélèvement de la cinétique.

Un témoin disque chargé de 15 μ g d'érythromycine est incubé avec les disques chargés avec le prélèvement de la cinétique été incubés à 30°C pendant 24 heures, pour comparer ensuite les diamètres afin de tester l'activité inhibitrice.

II.5 Résultats des tests biologiques:

Après 24H d'incubation des boîtes de Pétri contenant les disques imbibés des prélèvements cinétiques on a révélé des zones inhibitrices différentes d'une souche à l'autre chaque zone a été mesurée en cm, on retrouve les diamètres suivants.

➤ **Les diamètres obtenus sont donnés dans les tableaux ci-dessous**

Tableau11: Les diamètres obtenus pour E-COLI en fonction du temps de la libération d'ER.

Temps(min)	D (cm)
5	0.7
20	0.7
90	0.3
120	0.5
135	1.4
150	0.7
480	0.3

Tableau12: Les diamètres obtenus pour bacillus .S. en fonction du temps de la libération d'ER

Temps(min)	D(cm)
5	0.7
20	1.4
90	0.6
120	1
135	1.5
150	1.4
480	0.9

Tableau13: Les diamètres obtenus pour STAPH en fonction du temps de la libération d'ER

Temps(min)	D(cm)
5	0.6
20	1.2
90	0.6
120	0.6
135	0.7
150	1.2
480	0.7

➤ **Interprétation des tableaux :**

Nous remarquons que les diamètres sont différents pour chaque prélèvement cinétique pour les trois souches.

En ce qui concerne la souche E.COLI le diamètre augmente pour atteindre un maximum a 135 mn et la même remarque est relevé pour la souche Bacillus .S ce qui laisse a dire que le maximum est libéré a 135mn de cinétique de libération ce qui rejoint les résultats obtenus dans la première partie. Pour la souche Staphilococuss aureus le maximum d'inhibition est noté a 150 mn ce qui lui correspond le diamètre le plus important.

Nous constatons que la souche bacillus .S est la souche la plus inhibé par l'érythromycine libéré par le polymère.

➤ **Etude de l'inhibition par l'érythromycine dans le milieu liquide**

Nous avonsensemencé les prélèvements cinétiques par la suspenssion bactérienne des trois souches après incubation de 24H sous 30C° on retrouve les résultats suivants qui sont illustrés dans les graphes suivants :

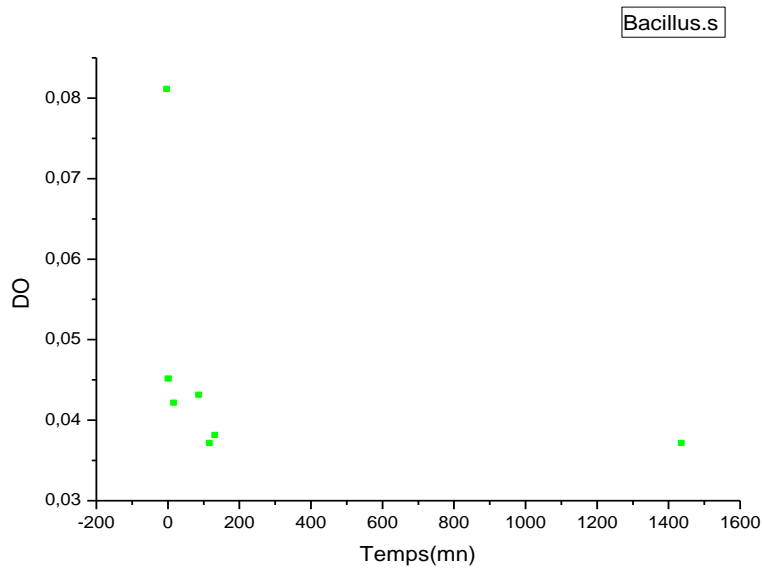


Figure 41: Evolution des DO des souches *S.bacillus* après 24h

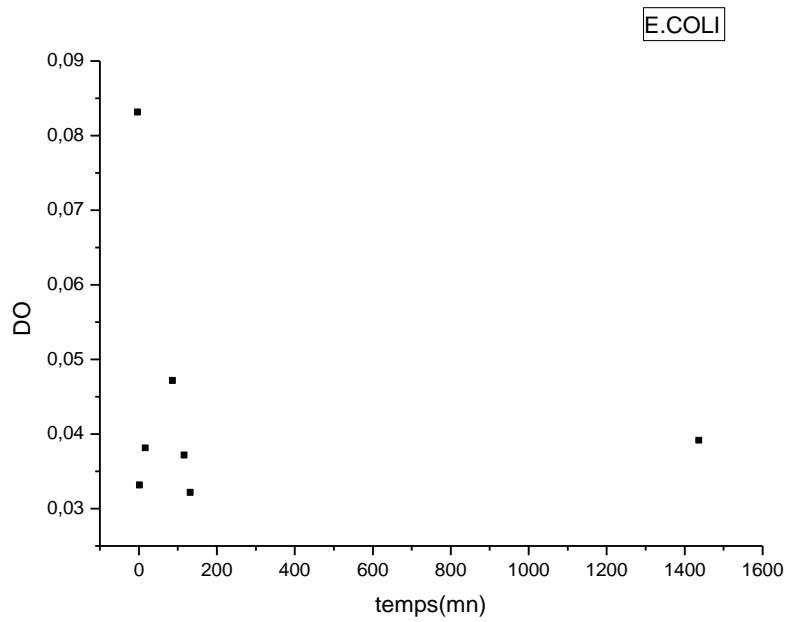


Figure 42: Evolution des DO des souches *E.coli* après 24h

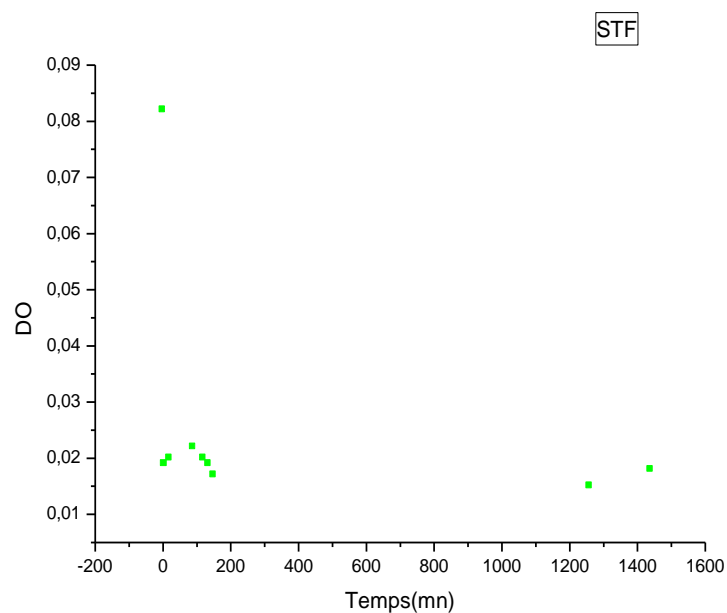


Figure 43: Evolution des DO des souches STAPH après 24h

Nous avons noté que pour le milieu liquide la DO a diminué dans les trois milieux testés ce qui nous laisse à dire que les souches ont été inhibées par l'antibiotique se trouvant dans, les prélèvements cinétiques puisque la lecture de l'absorbance a été effectuée à 600nm pour suivre la population bactérienne, la DO la plus faible est notée pour la souche STA.A qui est la plus résistante, ce qui rejoint le milieu solide.

Chapitre II:

Références bibliographiques

- (1) Belhadj Naima & Ben Halima Khadidja (Etude De L'activité Antibiotique Et Antioxydante De L'érythromycine Et La Quercitine A Partir Des Microsphères)(2017/2018)

- (2) A.Djeridane (2006), Phenolic Extracts From Varius Algerian Plants As Strong Inhibitors Of Porcine Liver Carboxyl Esterase. J Enzym Inhib Med Chem 21:719-726.

- (3) D.F. Brown, Brown L. Evaluation Of The E-Test, A Novel Method Of Quantifying Antimicrobial Activity. J. Antimicrobien. Chemother., 26, 185.190(1991)..

- (4) National Committee For Clinical Laboratory Standards. Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement. Wayne, Pennsylvania:NCCLS: Document M100-S9, Vol. 19. No. 1, Table 211999.

- (5) National Committee For Clinical Laboratory Standards (Nccls). Document M39-A. Analysis And Presentation Of Cumulative Antimicrobialsusceptibility Test Data; Approved Guideline. Nccls Document M39-A. Nccls, 940 Westvalley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, Usa, 30 Pp(2002)



Conclusion générale

Dans ce travail, on a préparé le triacétate de cellulose à partir du coton et par la suite à partir d'un polymère naturel : la cellulose, pour pouvoir le tester à la technique de l'encapsulation, en utilisant l'évaporation de solvant.

Le triacétate de cellulose a été caractérisé par différentes techniques tels que : infra rouge, DRX qui a révélé que le polymère est un polymère amorphe ce qui rejoint la DSC qui a révélé que le CTA est un polymère amorphe avec une T_g au alentours de 160°C , ce qui va influencer la libération des principes actifs, la RMN ^1H et ^{13}C est en accord avec la structure préconisée. Il a été réalisée une étude la libération de QR qui est un antioxydant très utilisé dans le domaine alimentaire et médicale et l'antibiotique : l'érythromycine, à partir des microparticules du triacétate de cellulose.

Les résultats obtenus nous amène à conclure que le milieu à pH acide, n'est pas approprié pour la libération de QR par contre pH=7.4 du colon est mieux adapté, En second lieu l'influence de la structure du principe actif utilisé dans la formulation joue un rôle important sur la libération du PA préférentielle dans le pH acide ou basique Le triacétate de cellulose se trouve le meilleur polymère pour la libération rapide en milieu intestinale. La technique de l'infra rouge a montré que la formulation à base de quercétine montre que le PA est dispersé dans la formulation puisque la bande caractéristique de la fonction éther. De la quercitrine se trouve dans le spectre des microparticules ce qui démontre la présence du PA dans la formulation.

Les résultats obtenus des activités étudiées montre que l'encapsulation est la meilleure Techniques pour préserver au maximum le caractère antioxydant ou antibiotique de principe actif, le CTA a montré une activité vis-à-vis des souches testés mais les résultats obtenus par la méthode de diffusion par disque montre une meilleure inhibition et la sensibilité des souches envers l'antibiotique utilisé la dégradation du polymère après 20 jours d'exposition à la source de lumière montre une meilleure libération mais pas d'altération de la quercitrine qui se trouve protégé par la matrice CTA.

À la lumière des conclusions tirées à partir de notre travail nous envisageons dans un avenir proche de tester les formulations préparées *in vivo* afin de compléter les recherches.



Annexe

1.1.1 Spectroscopie Infrarouge :

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} à 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.

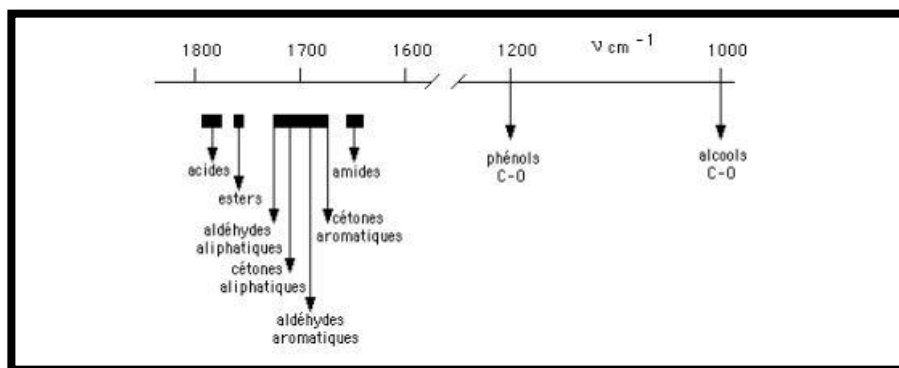


Figure 1: Exemples de valeurs des vibrations de valence (C=O ou C-O) de carbonyles, carboxyles et dérivés divers.

I. 1.2. 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.

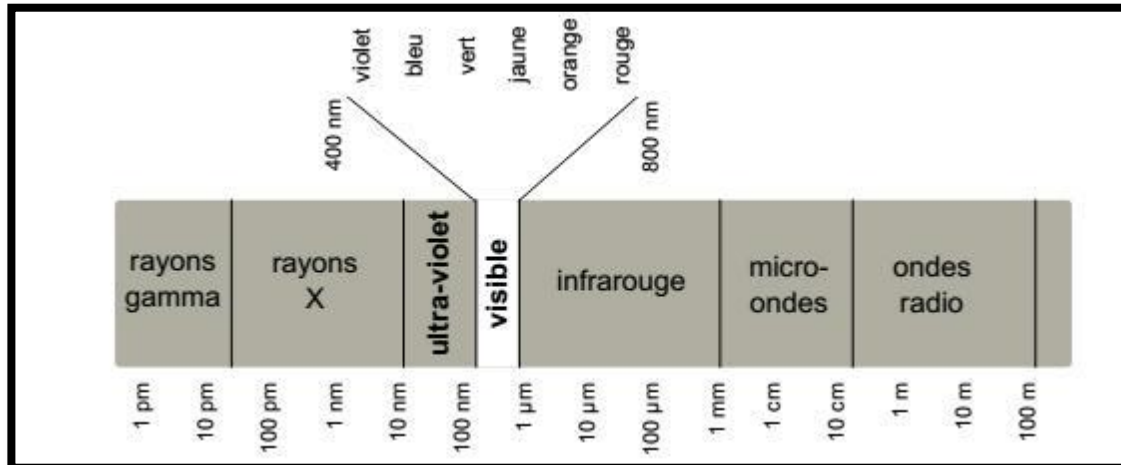
La diffraction des rayons X permet de distinguer des produits ayant la même composition chimique mais dont les arrangements atomiques diffèrent. Par exemple, les Carbonates de calcium comme la calcite et l'aragonite, de même formule chimique (CaCO_3), ont des diagrammes de diffraction différents. En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

1.1.3 Spectroscopie UV-visible :

La spectroscopie UV-visible est une méthode physique non destructive, très commune dans les laboratoires. Elle est basée sur l'interaction matière/rayonnement et la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée (1).

a-Domaine spectrale :

Un rayonnement électromagnétique est caractérisé par sa longueur d'onde (λ en nm) dont les différents domaines sont présentés ci-dessous :



Le domaine UV-visible s'étend environ de 800 à 10 nm.

- Visible : 800 nm (rouge) – 400 nm (violet)
- Proche UV : 400 nm -200 nm
- UV-lointain : 200 nm -10 nm

Cette technique nécessite l'utilisation d'un spectrophotomètre et permet de caractériser des molécules, de déterminer des concentrations d'espèces chimiques en solution et par extension de réaliser des suivis cinétiques

b-Principe :

Le principe de la spectroscopie UV –visible repose sur la transition d'un état Fondamentale vers un état excité d'un état électronique à un état électronique d'énergie plus élevée nécessite l'absorption d'énergie sous forme dans ce cas de photon.

Dans l'état Fondamentale, un atome ou une molécule se trouve dans son état de plus basse énergie, c'est à-dire que tous les électrons sont réparties sur des orbitales atomiques de plus basse énergies avec pas plus de deux électrons par orbitale.

La loi de Beer-Lambert donne une relation entre l'absorbance A et la concentration C de l'espèce chimique en solution: $A = \epsilon \cdot l \cdot C$

1.1.4 RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE :

➤ *Principe et méthodes :*

La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est basée sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. Tous les noyaux atomiques possèdent une charge en rotation, décrite par son terme de spin nucléaire.

Certains noyaux ne sont pas observables en RMN car ils n'ont pas de propriétés magnétiques.

Lorsqu'on soumet une molécule à un champ magnétique externe, ce champ agit non seulement sur les spins nucléaires, mais en même temps il induit dans un plan perpendiculaire à sa direction, une circulation des électrons autour du noyau. D'où l'existence d'un champ magnétique interne.

Ce dernier peut s'additionner au champ extérieur : c'est le phénomène de dé blindage ou s'opposer au champ extérieur : c'est le phénomène de blindage ou d'écran. Plus le blindage est intense, plus le noyau doit être soumis à un champ extérieur fort pour que se produise la résonance. Ceci se traduit par un déplacement des pics de résonance vers la droite du spectre.

L'inverse dans le cas du dé blindage. L'intensité du blindage ou du dé blindage dépend donc de l'environnement du noyau. Si les protons ont le même environnement chimique ils résonnent à la même valeur du champ : ils sont dits équivalents. Pour apprécier quantitativement le blindage que subit un proton, on utilise une référence, par exemple le signal que donnent les protons du tétraméthylsilane – TMS - $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$. Cet étalon interne présente de nombreux avantages : les 12 protons ont le même environnement chimique et fournissent un seul signal.

Il est utilisable en faible quantité car son signal est intense et sa résonance a lieu à champ plus fort que dans la plupart des cas donc son signal est bien séparé des autres et à l'extrême droite de l'enregistrement, il présente une grande inertie chimique vis-à-vis de la grande majorité des échantillons. Il est très volatil ($T_{eb} = 20^{\circ}\text{C}$) et s'évapore facilement de l'échantillon.

Pour un Proton, l'écart entre la valeur du champ pour lequel il résonne et cette origine constitue son Déplacement chimique par rapport au TMS.

Cette différence peut être exprimée soit en unités de fréquences (Hertz) soit avec une grandeur sans unité appelée le déplacement chimique (δ) qui s'exprime en ppm parties par million [7].

Résumé :

Dans ce travail nous avons procédé à l'extraction du triacétate de cellulose à partir du coton et la cellulose le polymère, pour l'utiliser à la formulation de microparticules, afin de libérer la quercitrine et l'érythromycine dans le pH reconstitué : pH 1.2 et pH 7.4. Les PA ont une préférence de dissolution dans le pH 7.4 puisque le taux de libération est plus important que dans le pH acide, l'exposition de la matrice à une source de lumière montre une bonne libération de la quercitrine, l'étude de l'activité antioxydante a soulevé que la quercitrine une fois encapsulée garde son caractère antioxydant révélé par réaction avec le DDPH. Nous avons constaté que le CTA représente une activité antibactérienne en vers les souches testées, l'étude de l'activité antibiotique montre que les souches sont sensibles à l'antibiotique puisque les diamètres mesurés sont comparables à ceux du disque témoin chargés par l'antibiotique. Les résultats obtenus répondent à nos attentes ce qui nous laisse envisager pour le futur une étude in vivo. Le CTA et les microparticules sont caractérisés par différentes techniques : MEB, IR, RMN, DSC, DRX.

Mots clés ; cellulose, encapsulation, activité antibiotique, la quercitrine

Abstract:

In this work we proceeded to extract the cellulose triacetate from the cotton and the cellulose the polymer, to use the microparticle formulation, in order to release quercitrin and erythromycin in the reconstituted pH: pH 1.2 and pH 7.4. PAs have a dissolution preference in pH7.4 since the release rate is greater than in the acid pH, exposure of the matrix to a light source shows good release of quercitrin, the study of the antioxidant activity shows that quercetin once encapsulated retains its antioxidant character revealed by reaction with the DDPH. We have found that CTA represents an antibacterial activity towards the bacterial strains, the study of the antibiotic activity shows that the strains are sensitive to the antibiotic since the diameters measured are comparable to those of the disk loaded by the antibiotic. The results obtained meet our expectations, which leave us to envisage for the future an in vivo study. CTA and microparticles are characterized by different techniques: SEM, IR, NMR, DSC, DRX.

Keywords ; cellulose, encapsulation, antibiotic activity, quercetin

ملخص

في هذا العمل، شرعنا في استخراج السليلوز ثلاثي الأسيتات من القطن والسليلوز البوليمر، لاستخدام تركيبة الجسيمات الدقيقة، من أجل إطلاق quercitrin و erythromycin في pH 1.2 و pH 7.4 المعاد تشكيلهما لدى PAs تفضيل للذوبان في pH 7.4 حيث أن معدل الإطلاق أكبر من الرقم الهيدروجيني الحمضي، إن تعرض المصفوفة لمصدر ضوئي يدل على إطلاق جيد للكيرسيتين، دراسة يظهر نشاط مضادات الأكسدة أن الكيرسيتين بمجرد تغليفها تحتفظ بطابعها المضاد للأكسدة الذي كشفه التفاعل مع DDPH لقد وجدنا أن CTA يمثل نشاطاً مضاداً للبكتيريا تجاه السلالات البكتيرية، وتبين دراسة نشاط المضادات الحيوية أن السلالات حساسة للمضاد الحيوي حيث أن الأقطار المقاسة قابلة للمقارنة لتلك الموجودة في القرص المحمل بواسطة المضاد الحيوي. النتائج التي تم الحصول عليها تلي توقعاتنا، الأمر الذي يجعلنا نتصور في المستقبل دراسة في الجسم الحي. تتميز CTA والجزيئات الدقيقة بتقنيات مختلفة: SEM، IR، NMR، DSC، DRX.

كلمات. السليلوز، التغليف، نشاط المضادات الحيوية، كيرسيتين