

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri
FACULTE DE MEDECINE
DE TIZI OUZOU



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة مولود معمور
كلية الطب
تيزي وزو

ⵜⴰⴳⴷⴰⵢⵜ ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⵜⴰⵖⴻⵔⴰⵏⵜ ⵜⴰⵙⴰⵎⴰⵢⵜ

Département de Pharmacie

N° D'ORDRE :

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie

Présenté et soutenu publiquement

Le 26 JUILLET 2021

Thème

*Mise au point et optimisation de microparticules à base de
biopolymère : application du procédé de gélification par
émulsification et caractérisations physico-chimiques*

Réalisé par : AIT TALEB Boualem BENREJDAL Ahcene
TAKHERBOUCHT Mohammed TIDMIMT Takfarinas

Membres de jury :

Dr. AYACHI N	MCA	Faculté de médecine	USD Blida	Présidente de jury.
Dr. DJELOULI S	M.A.H.U	Faculté de médecine	USD Blida	Examineur.
Dr. REBIHA S	M.A.H.U	Faculté de médecine	UMMTO	Examinatrice.
Dr. KESSAL F	M.A.H.U	Faculté de médecine	UMMTO	Promotrice.

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

En premier lieu, nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre promotrice, **Dr. KESSAL F** Maitre-assistante et responsable du laboratoire de Pharmacie galénique de la faculté de médecine de Tizi-Ouzou de nous avoir proposé ce sujet qui nous a permis d'approfondir nos connaissances ; merci pour tous vos judicieux conseils, au de-là de l'apprentissage, nous vous remercions aussi pour l'ambiance dans laquelle nous avons travaillé et la confiance que vous nous avez accordé. Votre exigence intellectuelle, vos encouragements et surtout votre patience et disponibilité ont été un réel atout dans notre avancement. Veuillez trouver ici docteur un témoignage de notre gratitude et de notre profond respect.

Nos vifs remerciements s'adressent à **Dr. AYACHI N** Maitre de conférence B en Pharmacie galénique à l'université de Blida de nous avoir fait l'honneur de présider le jury.

Nos remerciements vont également à **Dr. DJELOULI S** Maitre-assistant en Pharmacologie à l'université de Blida d'avoir bien accepté d'examiner notre travail et de l'enrichir par ses propositions.

Au **Dr. REBIHA S** Maitre assistante en Chimie minérale à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, nous vous sommes reconnaissants de faire partie du jury et d'évaluer notre travail.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance au **Pr. HOUALI K** Directeur de recherche au département microbiologie et de biochimie à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou ainsi qu'à toute son équipe et les remercier sincèrement de nous avoir accueilli dans leur laboratoire et pour avoir mis à notre disposition tout le matériel nécessaire à notre travail.

À toute l'équipe du laboratoire de Pharmacie Galénique **Mme HADJEM Z** et **Mme BOUZAR W**, pour l'aide qu'elles nous ont apporté durant notre travail.

Aux équipes de laboratoires de Toxicologie et de Chimie minérale, nous vous remercions de votre bienveillance et de votre disponibilité.

Aux **Mrs. TELLAL I** et **HAMEG CH**, futurs docteurs, vous nous avez toujours offert votre soutien, nous exprimons envers vous une profonde reconnaissance, MERCI.

Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail,

A mes chers parents que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour la patience illimitée, leur encouragement continu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices.

A mon frère et ma sœur pour leur grand amour et leur soutien qu'il trouvent ici l'expression de ma haute gratitude.

A mes chers amis que sans leurs encouragements ce travail n'aura jamais vu le jour.

Et a toute ma famille et tous ceux que j'aime.

Ahcene

Dédicaces

Je dédie ce travail,

A mes parents qui m'ont soutenu et encouragé durant ces années d'études et qui ont toujours été là pour moi. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A toute ma famille et mes ami(e)s, aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour vous. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de votre soutien que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle.

Boualem

Dédicaces

Je dédie ce travail,

A ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Particulièrement à mon père, pour le gout à l'effort qu'il a suscité en moi, de par sa rigueur.

A toi ma mère, ceci est ma profonde gratitude pour ton éternel amour, que ce rapport soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir.

A vous mon frère et sœurs, qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études, et à tous mes amis.

Mohammed

Dédicaces

J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers,

Je remercie le bon dieu de nous avoir donnée la volonté pour accomplir ce travail que je dédie tout d'abord.

A mes très chers parents qui m'ont toujours soutenu durant mes longues années d'études et leurs sacrifices pour mon bien être, que dieu me les garde.

A mes très chers frère et sœur Hamid et Inès

A Henia, Nacer et leur petite princesse Célia.

A mes ami(e)s, merci pour vos encouragements.

A toi qui m'as toujours épaulé, tu as su ressortir le meilleur de moi-même. Je te remercie infiniment ♥.

Takfarinas

SOMMAIRE :

LISTE DES ABREVIATIONS.....	i
LISTE DES TABLEAUX.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	iv
GLOSSAIRE.....	vi

Partie théorique

CHAPITRE I : Généralités sur les biopolymères et leurs applications en pharmacie galénique

INTRODUCTION GENERALE.....	1
1 Introduction.....	3
2 Historique.....	3
2.1 Classification.....	3
2.1.1 Bactéries.....	6
2.1.2 Algues	6
2.2 Propriétés.....	7
2.2.1 Structure chimique	7
2.2.2 Solubilité et stabilité	8
2.2.2.1 Ph du solvant.....	8
2.2.2.2 La force ionique	8
2.2.2.3 La présence d'ions divalents	8
2.2.3 Viscosité.....	8
2.2.4 Bioadhésion.....	9
2.2.5 Propriétés physico-chimiques des gels d'alginate.....	9
2.2.6 Stabilité et dégradation des gels.....	12
2.3 Extraction de l'alginate	12
2.3.1 Alginate de sodium	12

3	Définition d'un médicament	13
3.1	Compositions du médicament	13
3.1.1	Définition d'un principe actif.....	13
3.1.2	Définition d'un excipient	13
3.2	Les différentes formes pharmaceutiques.....	14
3.2.1	Formes liquides	14
3.2.2	Formes solides	14
3.2.3	Selon le système de libération du principe actif	15
4	Les alginates de sodium comme excipient.....	16
4.1	Chimie	16
4.2	Rôle de l'alginate de sodium	16
4.3	Développement d'un système à libération contrôlée	16
4.4	Systèmes de diffusions	17
4.5	Application de l'alginate dans les systèmes de délivrance des biomolécules.....	17

CHAPITRE II : Formulation d'émulsion et procédés de gélification

1	Définition d'une émulsion	19
2	Types d'émulsions	19
3	Composition d'une émulsion	20
3.1	Tensioactif.....	20
3.2	Différents types de molécules tensioactives.....	21
4	Démarche à suivre pour la formulation d'une émulsion.....	21
5	Procédés de gélification	22
5.1	Gélification ionotropique	22
5.1.1	Principe	22
5.2	Gélification interne – émulsification.....	23
6	Paramètres de formulation des microparticules d'alginate	24

6.1	Choix du polymère	25
6.2	Choix de l'agent gélifiant.....	25
6.3	Choix de l'huileuse.....	26
6.4	Choix de l'acide	26
6.5	Choix du tensioactif	26
7	Influence des paramètres de formulations sur les propriétés des microparticules.....	27
7.1	Concentration en alginate de sodium	27
7.2	Concentration du réticulant	28
7.3	Phase huileuse	29
7.4	Vitesse d'agitation.....	30
7.5	Temps de réticulation	30
8	Avantages et inconvénients du procédé de gélification interne.....	31

CHAPITRE III : Notion d'encapsulation et caractérisation des microparticules d'alginate

1	Définition de l'encapsulation.....	32
2	Composés pouvant être encapsulé	33
3	Matériaux pour l'encapsulation	33
4	Intérêt de l'encapsulation :.....	34
5	Procédés de microencapsulation	35
6	Domaines d'application	35
7	Evaluation in vitro des performances des microparticules d'alginate	37
8	Caractérisation physico chimique des microparticules d'alginate.....	37
8.1	Efficacité d'encapsulation	38
8.2	Spectroscopie UV-Visible.....	38

Partie pratique

Introduction.....	40
1 Préparation des microparticules polymériques à base d'alginate	41
1.1 Matériel	41
1.1.1 Matière première	41
1.1.2 Consommable	42
1.1.3 Equipement	42
1.2 Procédés et méthodes	43
1.3 Rapport de phases.....	44
1.3.1 Phase aqueuse (alginate, CaCO_3)	44
1.3.2 Phase huileuse (tensioactifs, huile, NaOH).....	44
1.3.3 Vitesse et temps d'émulsification	45
1.4 Réticulation	45
1.5 Lavage	46
1.6 Filtration	46
1.7 Séchage.....	46
1.7.1 Séchage à l'air libre.....	47
1.7.2 Séchage a l'étuve	47
1.7.3 Lyophilisation	47
1.7.3.1 Définition	47
1.7.3.2 Principe	48
1.7.3.3 Avantage de la technique (choix de la technique) :	48
1.7.3.4 Inconvénients de la technique :	48
2 Choix des composants et protocole.....	48
3 Essais d'orientation.....	49
3.1 Etape 01	51

3.2	Etape 02.....	53
3.3	Etape 03.....	55
3.4	Etape 04.....	59
3.5	Discussion générale.....	63
4	Essai proprement dit	63
5	Optimisation de la formule d'encapsulation de la formule du fénofibrate	64
5.1	Les paramètres influençant la libération de PA.....	64
5.1.1	La concentration en alginate de sodium (C1) et en carbonate de calcium (C2).....	64
5.1.2	La vitesse d'agitation :	64
5.2	Les critères d'acceptation.....	65
5.2.1	Taux de dissolution	65
5.2.2	Taux d'encapsulation	65
5.3	Matières et méthodes.....	65
5.3.1	Matière première	65
5.3.2	Méthodes.....	66
5.4	Caractéristiques physico chimiques	69
5.4.1	Evaluation des performances in vitro des microparticules d'alginate	69
6	Résultats et discussion	70

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	81
--	----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

RESUME

LISTE DES ABREVIATIONS

Ba	: Baryum
°C	: Degré Celsius
Ca	: Calcium
Cd	: Cadmium
E401	: Alginate de sodium
EE	: Efficacité d'encapsulation
E/H	: Emulsion eau dans huile
GG	: Séquence homopolymériques constituées d'un seul type de monomère G
H/E	: Emulsion huile dans l'eau
HLB	: Balance hydrophile lipophile
M/G	: Proportion de résidus mannuronique par rapport aux résidus guluroniques
MG	: Séquence hétéropolymériques composée de résidus M et G
Mg	: Magnésium
MM	: Séquence homopolymériques constituées d'un seul type de monomère M
Pb	: Plomb
PH	: Le potentiel hydrogène
Pka	: Constante d'acidité
®	: Marque déposée
SGF	: Milieu gastrique simulé
SGIF	: Milieu gastro intestinal simulé
SIF	: Milieu intestinale simulé
Sr	: Strontium

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différents types de colloïdes qui existent	4
Tableau 2 : Représentation des différentes formes solides des médicaments	15
Tableau 3 : Représentation des différentes formes solides de médicaments selon la libération du principe actif	15
Tableau 4 : Effet de la concentration d'alginate sur la taille moyenne des microparticules et l'EE du médicament des microparticules d'alginate.	28
Tableau 5 : Effet de la concentration de l'agent réticulant sur la taille moyenne des microparticules d'alginate et l'EE du médicament.	29
Tableau 6 : Matières utilisées dans la formulation des microparticules d'alginate.	41
Tableau 7 : Equipements utilisés dans la préparation des microparticules d'alginate	42
Tableau 8 : Concentrations des solutions d'alginate et de chlorure de calcium des différents protocoles proposés dans la préparation des microparticules d'alginate.	44
Tableau 9 : Différentes vitesses de rotation des protocoles proposés dans la préparation des microparticules d'alginate	45
Tableau 10 : Valeurs des paramètres testés lors des essais.	49
Tableau 11 : Paramètres de formulation des essais 1 à 4 de l'étape 01.	51
Tableau 12 : Paramètres de formulation des essais 5 à 8 de l'étape 02.	53
Tableau 13 : Paramètres de formulation des essais 9 à 16 de l'étape 03.	55
Tableau 14 : Taux d'humidité des essais 15 et 16.	58
Tableau 15 : Paramètres de formulation des essais 17 et 18 de l'étape 04.	59
Tableau 16: Taux d'humidité des essais 17 et 18.	60
Tableau 17 : Intervalles des valeurs retenues pour l'essai proprement dit	63
Tableau 18 : Matrice des essais d'optimisation.	64
Tableau 19 : Propriétés du fénofibrate.	65
Tableau 20 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F6 et F7	72

Tableau 21 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F4 et F9.....	73
Tableau 22 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F8 et F11.....	73
Tableau 23 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F3 et F10.....	74
Tableau 24 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F4 et F8.....	75
Tableau 25 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F6 et F10.....	76
Tableau 26 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F3 et F7.....	77
Tableau 27 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F9 et F11.....	77
Tableau 28: Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F6 et F11.....	78

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Monosaccharides formant les polysaccharides des algues	5
Figure 2 : Schéma représentatif de la paroi des algues brunes.....	6
Figure 3 : Structure chimique du polymère d'alginate	7
Figure 4 : Liaisons des ions calcium avec les résidus poly-G des polymères d'alginate	10
Figure 5 : Rétention du calcium par un réseau tridimensionnel de segments poly-M ou poly-G définissant une structure de type "egg-box"	10
Figure 6 : Effet de l'addition du calcium dans une solution d'alginate	11
Figure 7 : Schéma représentant les différentes formes pharmaceutiques	14
Figure 8 : Représentation de l'alginate de sodium.....	16
Figure 9 : Représentation schématique d'une émulsion.....	19
Figure 10 : Représentations schématiques d'une émulsion directe et inverse (en bleu l'eau, en jaune l'huile.....	20
Figure 11 : Schéma structural d'un tensioactif.....	20
Figure 12 : Propriétés du tensio-actif en fonction de son HLB.....	21
Figure 13 : Procédé de gélification ionotropique (goutte à goutte).....	23
Figure 14 : Procédure de réticulation.	24
Figure 15 : Différence entre microsphère et microcapsule	32
Figure 16 : Exemple de morphologie de particules obtenues par microencapsulation	33
Figure 17 : Centrifugation puis filtration de la matière formulée.	46
Figure 18 : Etuve de marque Memmert.	47
Figure 19 : Lyophilisateur Christ®.	48
Figure 20 :Aspect de la matière obtenue lors des essais 1, 2, 3 et 4	52
Figure 21: Matière emprisonnée dans la phase huileuse.....	54
Figure 22 : Matière bien réticulée et non emprisonnée.	57
Figure 23 : matière réticulées	58

Figure 24 : matière séchée à l'air libre.....	58
Figure 25 : matière séchée à l'étuve.....	58
Figure 26 : Matière réticulée après lavage.....	60
Figure 27 : Poudre sèche parfaitement individualisée.....	60
Figure 28: Microscope OPTIKA relié à un ordinateur.....	61
Figure 29 : Aspect granulométrique de la formulation 17.....	62
Figure 30 : Aspect granulométrique de la formulation 18.....	62
Figure 31 : Schéma représentatif du procédé de formulation des microparticules d'alginate..	68
Figure 32 : Dissolutest à palettes tournantes	69
Figure 33 : Spectroscopie UV-Visible.....	69
Figure 34 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F6 et F7.	72
Figure 35 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F4 et F9.	72
Figure 36 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F8 et F11.	73
Figure 37 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F3 et F10.	73
Figure 38 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F4 et F8.	75
Figure 39 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F6 et F10.	76
Figure 40 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F3 et F7.	76
Figure 41 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F9 et F11.	77
Figure 42: Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F6 et F11.	78

GLOSSAIRE

Exérèse : expulsion de la matière encapsulée dans les microparticules d'alginate causée par une réticulation excessive reflétant ainsi la déperdition de la dose médicamenteuse.

Partie théorique

Introduction Générale

A l'heure actuelle, l'industrie pharmaceutique en général et le médicament en particulier connaît une ascension en terme d'innovation thérapeutique par la synthèse de nouvelles molécules actives. Cette évolution confronte les industriels à un autre défi, celui de l'innovation en terme de conception en pharmacie galénique. Cette dernière fait l'objet de différentes contraintes aussi bien pharmacologiques que d'impératifs économiques. En plus de se porter sur ces deux derniers, les industriels considèrent que le volet écologique constitue un point incontournable et optent pour des matières premières biodégradables dans le développement et la conception de leurs nouvelles formes galéniques.

L'alginate de sodium étant un bio polymère très répandu et dont l'extraction est peu coûteuse est devenu l'une des matières premières les plus courantes dans l'industrie pharmaceutique. Utilisé en tant que principe actif ou qu'excipient en raison de sa capacité de gélification qui suscite un grand intérêt notamment dans la réalisation de microparticules à libération contrôlées.

L'obtention de microparticules d'alginate nécessite un procédé de fabrication bien conçu, actuellement plusieurs méthodes de préparation sont utilisées dont la gélification interne. Ce mémoire aborde la mise au point et l'optimisation de microparticules à base d'alginate via un procédé gélification interne ou autrement dit gélification par émulsification. L'objectif est d'étudier les propriétés physicochimiques de ces formes en vue d'une libération contrôlée dans l'organisme et d'optimiser la méthode de formulation afin de garantir les meilleures performances biopharmaceutiques en vue d'une libération prolongée.

La maîtrise du procédé de fabrication de microparticules à base de biopolymère à savoir l'alginate de sodium, se fait en variant plusieurs facteurs de formulation tels que la concentration en alginate, concentration de l'agent réticulant, la phase huileuse, le surfactant, le temps de réticulation et la vitesse d'agitation.

Le manuscrit s'organise en deux parties, une partie théorique et une deuxième partie pratique. Concernant la partie théorique, dans un premier temps, les généralités sur les bio polymères ainsi qu'une présentation détaillée de la structure chimique, des propriétés et des mécanismes de gélification de l'alginate seront abordées tout en ajoutant son utilisation en tant qu'excipient en pharmacie galénique (chapitre 1). Dans un second temps la formulation des émulsions ainsi que les procédés de gélification seront abordés tout en s'attardant sur le principe

et l'influence de certains paramètres de formulation (concentration d'alginate, de l'agent réticulant, etc...) sur la gélification et les propriétés des microparticules (chapitre 2).

Enfin, avant d'aborder la partie pratique nous terminerons avec l'encapsulation, la caractérisation physico-chimique et l'évaluation in vitro des performances des microparticules (chapitre 3).

Concernant la partie pratique, nous détaillerons la manipulation et les différentes formulations et études réalisées au laboratoire durant toute notre étude.

**Chapitre I : Généralités
sur les biopolymères et
leurs applications en
pharmacie galénique**

1 Introduction

Ces dernières années, la recherche perpétuelle de nouveaux matériaux plus performants et mieux adaptés aux exigences de l'époque s'est avérée être un nouvel enjeu incontournable. Les biopolymères, tels la cellulose ou l'alginate, sont des polymères issus d'organismes vivants ou de polymères synthétisés à partir de ressources renouvelables. Ces polymères connaissent depuis quelques années un réel essor du fait de leurs origines biologiques et surtout de leur caractère biodégradable. Leurs utilisations en substitution ou même en mélange à d'autres polymères synthétisés à partir d'hydrocarbures offrent donc des applications intéressantes dans de nombreux secteurs y compris le domaine pharmaceutique.

2 Historique

L'utilisation des alginates dans les application alimentaires date depuis plus de cinquante ans. C'est en 1883 que l'anglais Stanford isola ce qu'il nomma "Algine" depuis *Laminaria digitata*, il additionna de la soude à un résidu d'algues, filtra le liquide, le concentra puis passa en milieu acide ce qui donna un précipité gélatineux blanchâtre. En 1907 on se rendit compte que l'algine libérait des ions H^+ (comme les acides) d'où sa nouvelle dénomination « acide alginique ».

Cette substance a été utilisée en 1927 par le docteur Thornley pour la première fois afin d'agglutiner sous forme de brique de poussière de charbon. Suite à son expérience, il conçut la Kelco Company, usine destinée à l'extraction de l'acide alginique de *Macrocystis pyrifera*. Kelco production et l'alginate Corporation of America furent les premiers à déposer les brevets [1, 2].

2.1 Classification

Les alginates sont considérés comme colloïdes. Ce mot désigne les substances qui comportent deux phases distinctes, et dont les particules d'une phase, discontinues, sont très petites, et diffusent dans l'autre phase. Différentes catégories de colloïdes sont distinguées selon la nature des phases qui sont présentes. Dans le cas de l'alginate, le milieu correspond à une phase continue (tout comme la gélatine) tandis que la phase dispersée correspond à une phase liquide, comme on peut le voir sur le tableau 1.

L'alginate et la gélatine par définition sont considérés comme des **hydrocolloïdes**, solubles dans l'eau où ils se dissolvent pour former un gel avec des propriétés rhéologiques particulières.

On parle de **phycolloïdes** lorsqu'un colloïde est issu d'algues. C'est une des sources majeures de la production d'alginate qui sont extraites à partir de certaines algues qui seront cités dans les paragraphes suivants. Les principaux colloïdes extraits des algues sont des polysaccharides qui constituent généralement la matrice extracellulaire de ces organismes [3].

Il est nécessaire que ces végétaux soient relativement flexibles en raison de leur environnement, c'est pour cela que les polysaccharides sont des polymères doués d'une capacité de gélification. A l'heure actuelle trois principales classes d'algues sont utilisées avec pour chacune d'entre elles ses propres polysaccharides caractéristiques :

-l'**acide alginique** et les fucanes pour les Phaeophyceae

-les **carraghénanes** et l'agar-agar (gélrose) des Rhodophyceae

-les **polysaccharides complexes** des Chlorophyceae.

Tableau 1 : Les différents types de colloïdes existants [4].

Milieu/phase		Phase dispersée		
		Gaz	Liquide	Solide
Milieu continu	Gaz	Aucun (tous les gaz sont miscible).	Aérosol liquide Exemple : brouillard, brume, nuage.	Aérosol solide Exemple : fumée, particules aériennes.
	Liquide	Mousse Exemple : crème fouettée, mousse au chocolat.	Emulsion Exemple : Lait, mayonnaise, savon liquide.	Sol Exemple : peinture, encre.
	Solide	Mousse solide Exemple : aérogel Polystyrène expansé.	Gel Exemple : gélatine, gelée, fromage, alginate.	Sol solide Exemple : verre.

La constitution de chacun de ces polysaccharides varie et on retrouve des monosaccharides différents pour chaque type comme l'indique la figure 1.

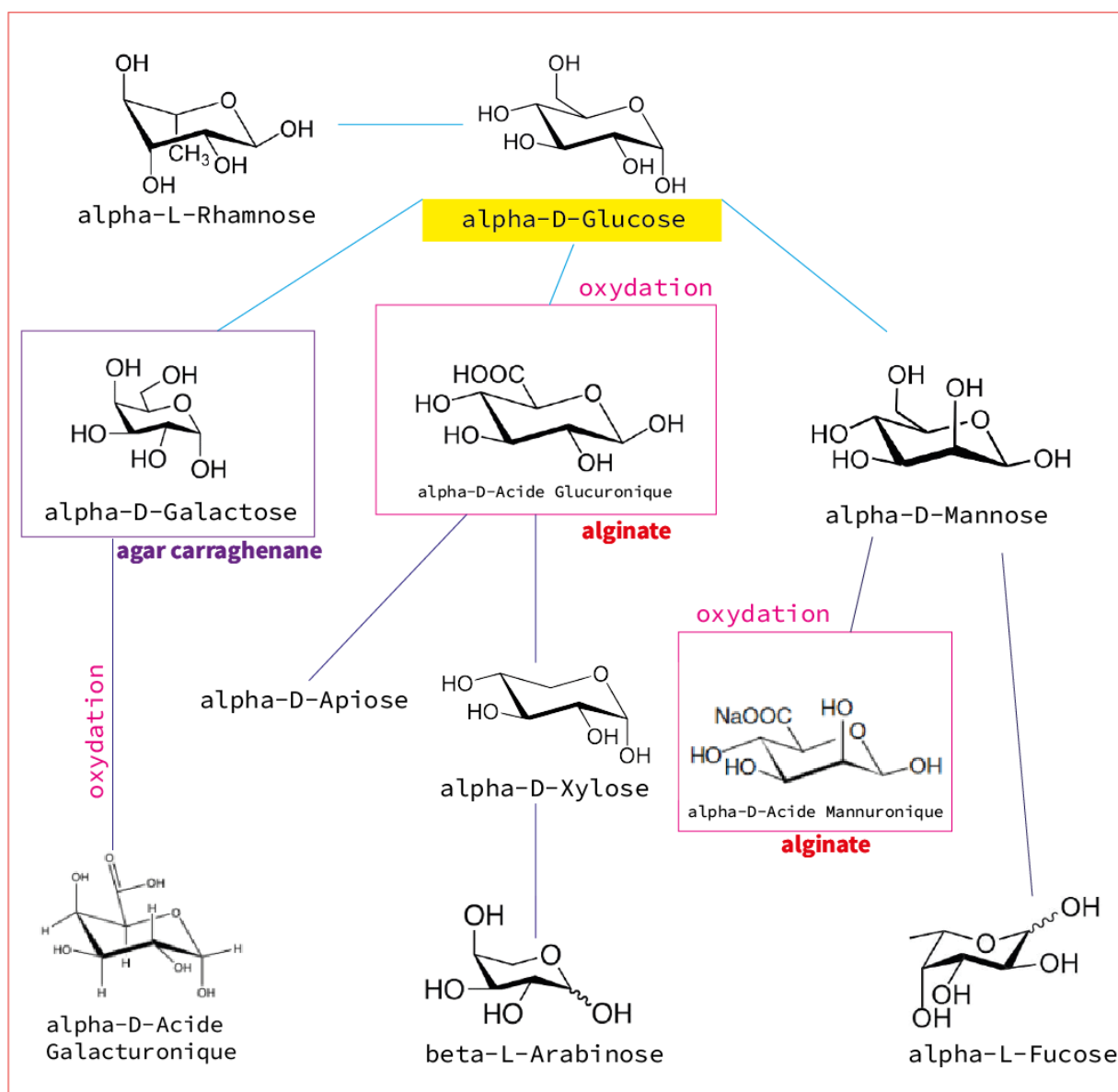


Figure 1 : Monosaccharides constituant les polysaccharides des algues [5].

D'autres polymères sont également présents comme la cellulose des Chlorophyceae, les mannanes, les xylanes, l'hémicellulose, les pectines, etc...

Les polysaccharides présentés dans la figure 2 sont considérés comme des polysaccharides structuraux car ils constituent principalement la paroi des végétaux et définissent la structure principale de ces végétaux.

Cependant il existe aussi des polysaccharides de réserve dans les algues tels que l'amidon par exemple [3].

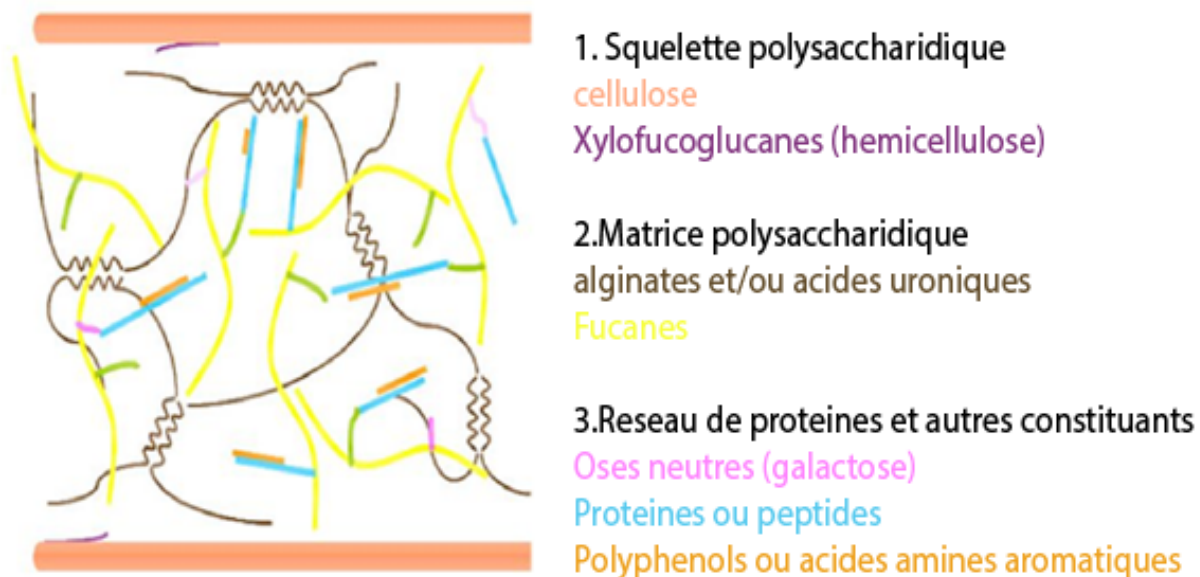


Figure 2 : Schéma représentatif de la paroi des algues brunes [5].

Les alginates sont issus de deux sources principales, bactéries et algues brunes.

2.1.1 Bactéries

Plusieurs espèces bactériennes sont impliquées dans la synthèse d'alginate, essentiellement les bactéries aérobies fixatrices d'azote «*Azobacter vinelandi*» mais aussi le *Pseudomonas aeruginosa* qui est une bactérie pathogène, la molécule d'alginate présente un rôle important dans le cycle de vie de la bactérie, elle offre une protection vis-à-vis l'action des phagocytes, les antibiotiques et la déshydratation par la formation d'une capsule qui enferme la bactérie. Le progrès de la science dans la manipulation génomique a permis par cette voie de synthèse de contrôler la structure du polymère ainsi la production d'une alginate en copolymère en Bloc.

Cette voie de synthèse est moins courante par rapport à la synthèse à partir des algues et cela revient à plusieurs paramètres comme le coût mais indépendante des conditions climatiques et la pollution [3, 6].

2.1.2 Algues

Les alginates polysaccharidiques naturelles issues des algues brunes, constituent 40% de leur poids sec, c'est un mélange d'alginate de Na, K, Ca [3, 6].

2.2 Propriétés

2.2.1 Structure chimique

Le polymère d'alginate est composé de deux unités monomériques : les résidus d'acide D-mannuronique (M) liés par des liaisons beta (1→4) et des résidus d'acide L-gulonique (G) liés par des liaisons alpha-(1→4) [7-9]. La structure de base des alginates est constituée d'unités linéaires non ramifiées de polymères constitués de monomères disposés en blocs de M et des résidus G entrecoupés de régions contenant des séquence M-G au sein de la structure comme le montre la figure 3 [10, 11].

La composition d'un polymère d'alginate varie selon l'origine de l'espèce d'algue dont il est extrait. La proportion et les séquence des résidus M et G détermine le poids moléculaire et modifie les propriétés physiques de ce dernier. Le polymère d'alginate peut comporter des régions homopolymériques constituées exclusivement d'un seul type de monomère (blocs M ou blocs G) ou une séquence hétéropolymériques composée de résidus M et G (blocs MG) [6, 12].

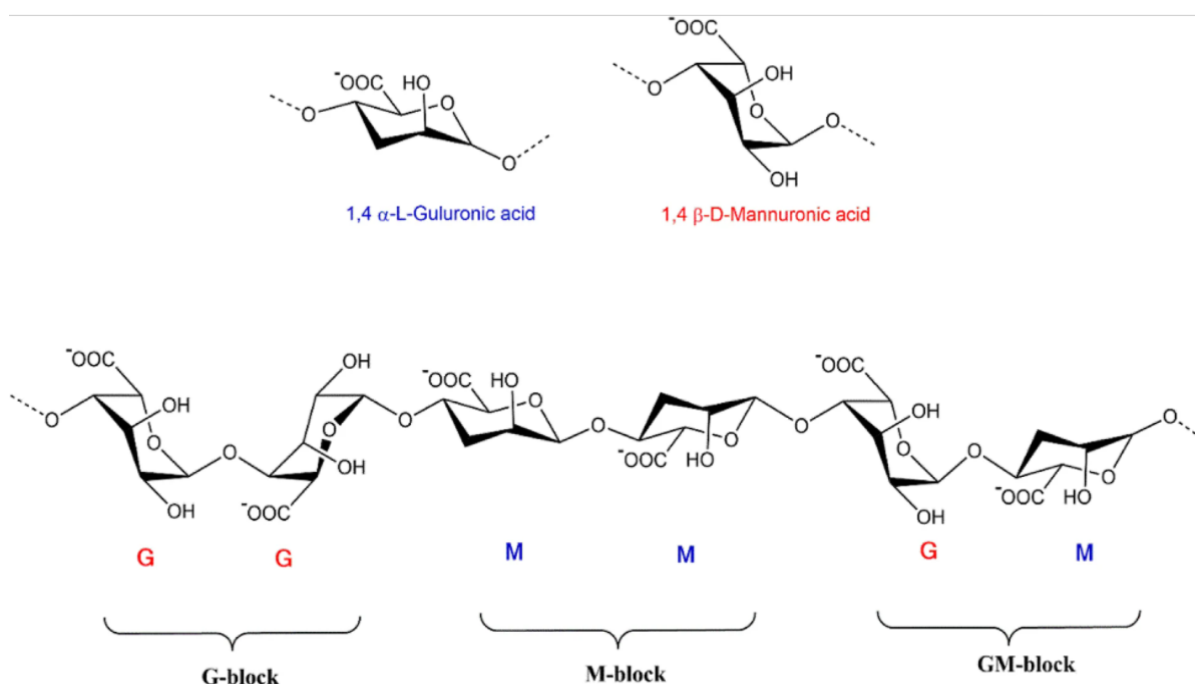


Figure 3 : Structure chimique du polymère d'alginate [13].

Dans le commerce, les alginates sont disponibles sous forme de sodium, de potassium ou de sels d'ammonium. Les poids moléculaires de l'alginate varient généralement de 60 000 à 700 000 Daltons selon l'application [14].

2.2.2 Solubilité et stabilité

La stabilité de l'alginate au stockage est excellente lorsque la poudre est stockée dans un récipient bien fermé (à sec) [9].

Sa solubilité varie en fonction de type de solvant utilisé, soluble dans l'eau froide formant des solutions visqueuses de nature colloïdale et insoluble dans les solvants organiques (éther, chloroforme...) et les solvants de nature alcoolique dont la teneur en alcool est supérieure à 30%. La solubilité de l'alginate dépend de trois paramètres principaux [11].

2.2.2.1 pH du solvant

La valeur du Pka du polymère d'alginate est voisin des valeurs des monomères qui le composent soit 3,38 et 3,65 pour l'acide mannuronique et l'acide guluronique respectivement. La chute brutale du pH entraîne la précipitation des molécules d'acide alginique. Pour les faibles valeurs de pH, la solubilité dépend des séquences composant le polymère (Séquences GG < séquences MM < séquences MG) [11].

2.2.2.2 Force ionique

La force ionique représente l'activité des ions d'une solution aqueuse, c'est à dire qu'elle intervient dans la force d'attraction et répulsion entre les particules colloïdales. Cette force agit par la présence de groupements anioniques au niveau du polysaccharide 'alginate' [11].

2.2.2.3 Présence d'ions divalents

la solubilité d'alginate est influencé par l'interaction de ses groupement carboxylique ($-\text{COO}^-$) avec les ions divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}), cette constatation est importante pour choisir les bons ingrédients de préparation par exemple éviter une eau qui est dure dont les teneurs en calcium sont assez élevées [15].

2.2.3 Viscosité

Il existe différents grades d'alginate de sodium avec des viscosités différentes en fonction de leur provenance, espèces d'algues et de la saison ce qui donne une variation structurale du polysaccharide. Il existe aussi une relation inversement proportionnelle entre la viscosité et la vitesse de cisaillement [15, 16].

La protonation des groupes carboxylates dans la structure de l'alginate qui forme des liaisons hydrogènes sont à l'origine de sa viscosité. Malgré qu'elle est constante dans un pH compris

entre 6 et 8, elle augmente fortement lorsque le pH est réduit jusqu'à atteindre une viscosité maximale à pH entre 3 et 3.5 [17, 18].

2.2.4 Bioadhésion

La Bioadhésion se définit comme étant un contact entre deux surfaces dont l'une est un substrat biologique, si l'une de ces surfaces est une muqueuse on parlera de la mucoadhésion.

L'alginate présente des propriétés mucoadhésives, cette propriété est exploitée dans le domaine de la bioencapsulation comme matrice d'encapsulation des médicaments administrés par voie orale [19].

2.2.5 Propriétés physico-chimiques des gels d'alginate

La structure conditionne les propriétés physico-chimiques des solutions et des gels d'alginate en milieux aqueux. Notamment la proportion de résidus mannuronique par rapport aux résidus guluroniques (rapport noté M/G) mais aussi nombre et la longueur des blocs MM, GG et MG [20].

Le degré d'ionisation des groupements carboxyliques portés par les unités monomères conditionne la solubilité des alginate en solution aqueuse. Ainsi, les alginate monovalents sont parfaitement solubles dans l'eau en association à des cations alcalins monovalents car les groupements carboxyliques présents dans les molécules d'alginate sont ionisés, contrairement à l'acide alginique qui est insoluble dans les solutions aqueuses qui précipite quand le pH est inférieur à 3,5 [3].

Les solutions aqueuses d'alginate sont très visqueuses en raison de leurs contenances en fragments poly(α -L-guluronate) rigides. La rigidité et la viscosité de l'alginate est traduite par la présence d'un groupement chargé sur la chaîne. Cette propriété des alginate est utilisée dans l'industrie comme épaississant. Les alginate de sodium se dissolvent dans l'eau en formant des solutions colloïdales visqueuses à comportement pseudo-élastique et ce pour de faibles concentrations [3, 11].

L'addition progressive de cations divalents (Ca^{2+} par exemple) provoque la formation d'un gel élastique, non thermoréversible et cela par rétention des segments guluroniques des ions calcium en coopération par des chaînes parallèles. Les ions calcium s'associent préférentiellement aux fragments **poly-guluronate** plutôt qu'aux fragments poly-mannuronate

(figure 4) et cela en raison de leur conformation spatiale, permettent une chélation plus énergétique des ions. Ces derniers sont retenus dans une « cage » et interagissent avec les fonctions carboxylates et les atomes d'oxygène des fonctions hydroxyles. Les ions calcium sont beaucoup mieux retenus que par de simples liaisons ioniques. Cet enchaînement régulier de type « egg box » (figure 5) se reproduit périodiquement : il se forme un réseau tridimensionnel à zones organisées reliées par les segments poly-M ou poly-(M-G) [21].

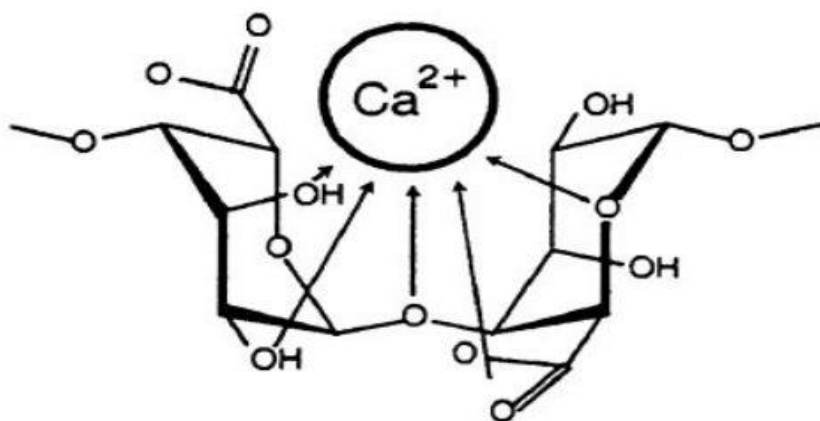


Figure 4 : Liaisons des ions calcium avec les résidus poly-G des polymères d'alginate [22].

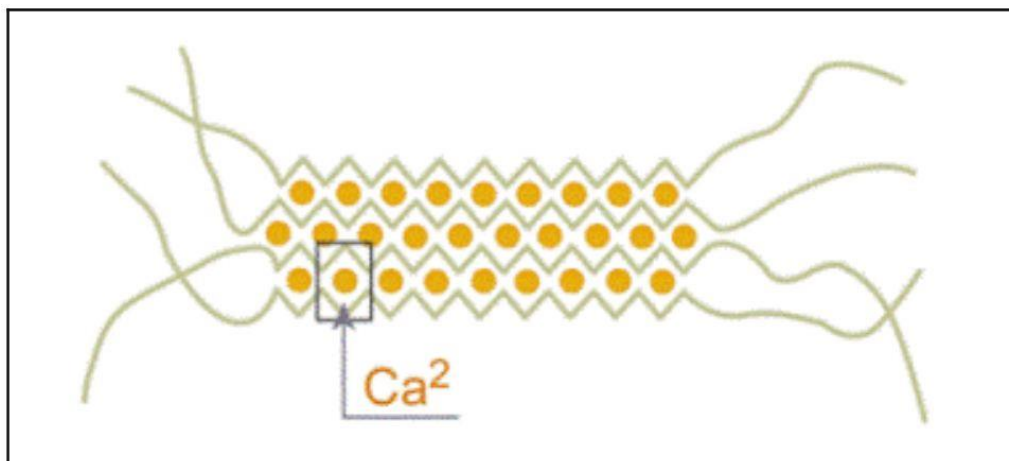


Figure 5 : Rétention du calcium par un réseau tridimensionnel de segments poly-M ou poly-G définissant une structure de type "egg-box" [23].

La structure du polymère est donc l'élément déterminant du comportement rhéologique des gels d'acide alginique : la proportion des blocs poly-G et leur longueur conditionnent la formation

et la force des gels obtenus en présence de calcium. On peut d'ailleurs remarquer que, in vivo, les tissus les plus anciens dans l'évolution et les plus résistants sont aussi les plus riches en acide L-guluronique [21].

Dans le cas de la gélification avec les ions calcium, il existe trois états physiques différents selon la concentration de cet élément. A très faible concentration, il y a formation d'agrégats (microgel) qui provoquent une diminution de la viscosité de la solution d'alginate. Puis à partir d'une certaine concentration, les macromolécules se réarrangent pour former un réseau tridimensionnel (gel continu) (figure 6). Si la concentration en calcium augmente encore, on observe un phénomène de synérèse qui est une séparation d'un liquide de son gel (gel continu avec démixtion) dû à une diminution du taux de gonflement des chaînes d'alginate avec expulsion d'eau hors du réseau [3, 11, 15].

Par ailleurs certaines études ont montré que la gélification de l'alginate dans une solution ne contenant que des ions calcium conduit à la formation d'un gel non homogène. En effet, la diffusion des ions calcium provoque une gélification de « microparticules » d'alginate de l'extérieur vers l'intérieur [3, 14, 15].

L'alginate a alors tendance à migrer vers la zone de gélification. De ce fait, il s'établit un gradient de concentration en alginate à l'intérieur du gel. C'est un phénomène que l'on souhaite éviter, car il complique singulièrement le calcul du coefficient de diffusion [3, 15].

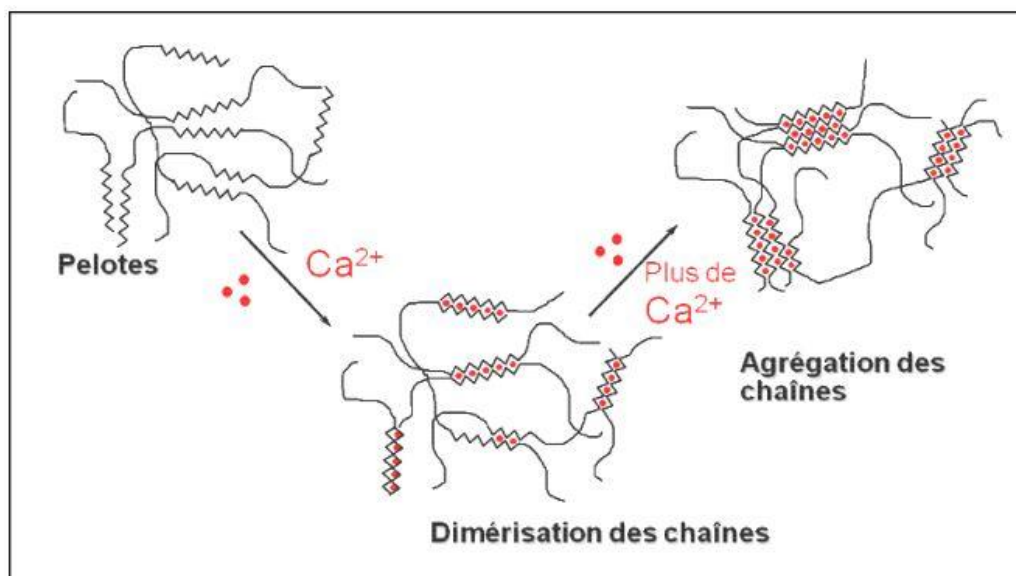


Figure 6 : Effet de l'addition du calcium dans une solution d'alginate [24].

En haut à gauche de la figure 6 ; les polymère polyM et polyG ne sont pas liés. Avec l'ajout d'une concentration faible en calcium, on constate un assemblage des chaînes. En haut à droite l'ajout de calcium.

Pour obtenir un gel homogène, il faut ajouter du chlorure de sodium (NaCl_2) à la solution de chlorure de calcium (CaCl_2) qui sert à gélifier l'alginate, ainsi qu'à la solution d'alginate. Ainsi l'alginate n'a plus tendance à se déplacer vers la zone de gélification, car la présence d'ions sodium conduit à un équilibre des charges [3, 15].

2.2.6 Stabilité et dégradation des gels

Les gels d'alginate de calcium ne sont pas solubles dans l'eau. Toutefois on peut obtenir une dissolution si on déplace les ions calcium par un chélateur ou aussi par de fortes concentrations de sodium ou de magnésium. Ce déplacement engendre une diminution de réticulation et une augmentation de son instabilité. Nous avons aussi la possibilité de traiter les gels par des tampons phosphate 0,1M ou citrate 0,1M. Néanmoins cette dissolution peut être empêchée par la présence en solution d'ions calcium libre dans un rapport adéquat. En fin, Les gels sont dégradés par hydrolyse acide [3].

2.3 Extraction de l'alginate

2.3.1 Alginate de sodium

Les chaînes d'alginate sont composées d'unités d'acide mannuronique et guluronique dont les valeurs Pka sont 3,38 et 3,36, respectivement. L'acide alginique, généralement précipite à température ambiante et pH inférieur à 3,6 [25].

On obtient et purifie les alginates en forme de poudre à partir des algues brunes, par une extraction alcaline en utilisant du carbonate de sodium, de l'hydroxyde de sodium ou de l'hydroxyde d'aluminium gélamineux à pH supérieur à 6,0. Ensuite, on précipite les alginates du filtrat par divers techniques : acidification, addition d'ions Ca^{2+} ou éthanol [26, 27].

La dépigmentation de la poudre d'algue avant l'extraction est primordiale pour réduire la coloration brune du produit final. Les polyphénols états des impuretés qui altèrent la pureté et les propriétés rhéologiques de l'alginate, sont éliminés en les rendant sous forme de formaldéhyde insolubles dans le solvant d'extraction [26-28].

Pour estimer le niveau poly phénolique dans le produit final isolé au cours de l'extraction on utilise la spectroscopie de fluorescence d'une longueur d'onde d'émission de 450nm [29].

3 Définition d'un médicament

Le code de la santé définit ainsi le médicament : Art. 208. *« Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique. »*

3.1 Compositions du médicament

Un médicament est composé de deux types de substances, un principe actif qui est responsable de l'effet sur l'organisme humain et une partie inactive faite d'un ou plusieurs excipients.

3.1.1 Définition d'un principe actif

Le principe actif est la molécule qui dans un médicament possède un effet thérapeutique. Cette substance est, la plupart du temps, en très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients.

3.1.2 Définition d'un excipient

Un excipient est défini comme « tout composant, autre que le(s) principe(s) actif(s), qui est présent dans un médicament ou utilisé pour sa fabrication ». La fonction d'un excipient est de servir de vecteur au(x) principe(s) actif(s), ou d'entrer dans la composition du vecteur, contribuant ainsi à certaines propriétés du produit telles que la stabilité, le profil biopharmaceutique, l'aspect et l'acceptabilité pour le patient, la facilité de fabrication [3].

La formulation d'un médicament comprend généralement plusieurs excipients. Un excipient n'est donc pas défini par une composition chimique particulière mais par son utilisation, qui découle des propriétés physico-chimiques qui le rendent apte à remplir son rôle d'excipient. Deux autres termes sont utilisés suivant que les préparations sont liquides ou solides. Dans le premier cas on parle de véhicule, alors que pour les préparations solides on parle de base [3].

3.2 Différentes formes pharmaceutiques existantes

La figure 7 résume les différentes formes pharmaceutiques des médicaments :

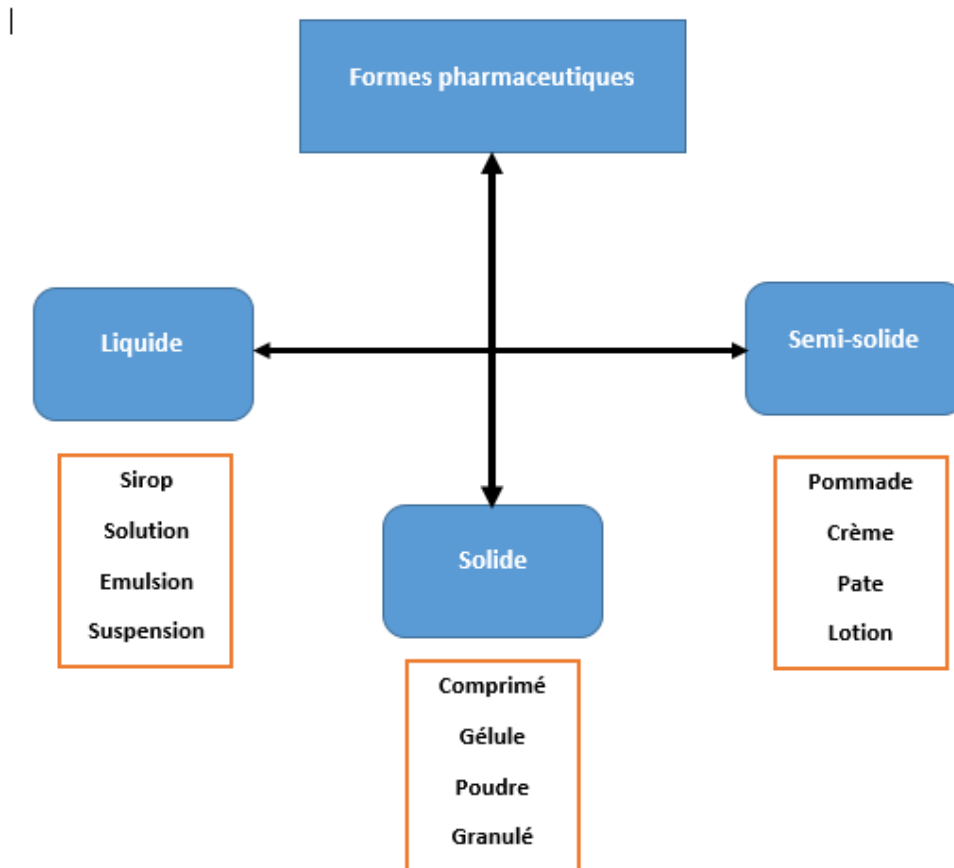


Figure 7 : Schéma représentant les différentes formes pharmaceutiques [30-32].

3.2.1 Formes liquides

Les plus utilisées en pédiatrie, adaptées pour les enfants, en raison de leur facilité d'utilisation et permettent une adaptation des doses en fonction du poids, elles ne nécessitent pas de dissolution dans le tube digestif d'où leur action rapide. Elles sont représentées par : les sirops, les solutions, les émulsions et les suspensions [30-32].

3.2.2 Formes solides

Elles constituent la majorité des médicaments sur le marché en vue de la meilleure stabilité du principe actif, ces formes sont regroupées dans le tableau 2 comme suit :

Tableau 2 : Représentation des différentes formes solides des médicaments [30-32].

Comprimés	Forme pharmaceutique la plus répandue, obtenue par compression des particules de poudres renfermant une unité de prise de médicament à avaler, croquer ou dissoudre dans l'eau.
Gélule	Forme solide, que l'on avale par voie orale. Elle est constituée d'une enveloppe dure, creuse qui contient la substance active
Poudres	Constituée de particules solides sèches, libres et plus ou moins fines utilisée pour l'administration d'au moins un principe actif de médicament par différentes voies d'administration
Granulés	Préparation constituée par des grains solides et secs formés par un agglomérat de particules de poudre. Cette forme galénique est destinée à une administration par voie orale.

3.2.3 Selon le système de libération du principe actif

Les médicaments sont aussi classés selon le système de libération de la matière active qu'elle contient. Les différentes formes sont désignées dans le tableau 3 :

Tableau 3 : Représentation des différentes formes solides de médicaments selon la libération du principe actif [30-32].

Forme à libération immédiate	Absorption rapide et plus intense du principe actif ainsi qu'un délai d'action réduit : Comprimés effervescent et lyophilisats oraux
Forme à libération retardée	Durée d'action prolongée, d'où la réduction de nombre de prise. La dissolution et l'absorption du principe actif s'effectue au niveau intestinal : Elle concerne majoritairement les formes gastrorésistantes.
Forme à libération prolongée et séquentielle	Les formes à libération séquentielle et prolongée favorise la libération du principe actif dans le temps afin de maintenir une concentration plasmatique efficace.

4 Alginate de sodium comme excipient

4.1 Chimie

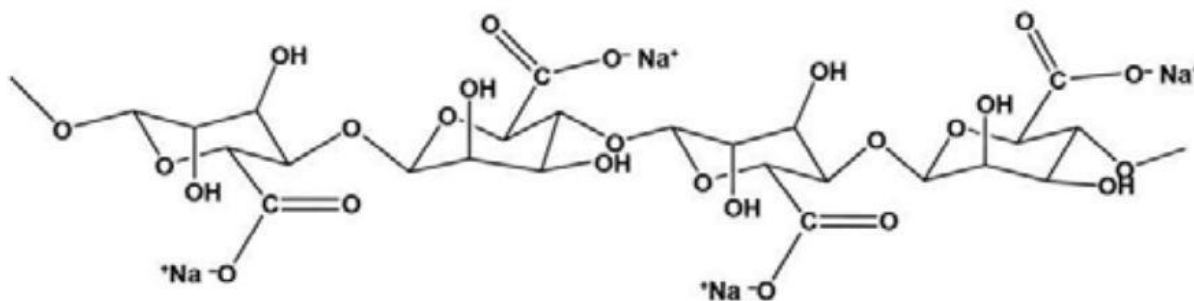


Figure 8 : Représentation de l'alginate de sodium [23].

En tant qu'excipient, le symbole E401 est le plus souvent utilisé.

Trois propriétés caractérisent cet excipient :

- Son acidité avec un pH=7.2 ;
- Sa solubilité : il est pratiquement insoluble dans l'éthanol, l'éther, le chloroforme, les solvants organiques et les solutions acides aqueuses dont le pH est inférieur à 3. En présence d'eau, il forme une solution colloïdale.
- Sa viscosité qui varie en fonction de la concentration, de la température, de la présence d'ions métallique [3].

4.2 Rôle de l'alginate de sodium

L'alginate (figure 8) est utilisé dans les formulations galéniques à libération immédiate avec effet systémique soit comme agent de liaison soit comme désintégrant.

Cependant certaines formes nécessitent une libération prolongée et l'alginate de sodium est utilisé pour y parvenir [33].

4.3 Développement d'un système à libération contrôlée

La libération contrôlée des principes actifs est assurée par des barrières physiques ou chimiques dont la conception se base sur plusieurs techniques à titre d'exemple l'enrobage d'un noyau contenant un principe actif ou incorporation du principe actif dans une matrice polymère [33].

L'alginate de sodium peut jouer un rôle important dans la conception de ces formes, dont la formulation est assurée par des techniques qui se basent sur des systèmes de diffusion [33].

4.4 Systèmes de diffusions

Les systèmes de diffusions basés sur l'alginate peuvent être divisés en deux :

- système de membrane.
- système de la matrice polymère

➤ Système de membrane

Dans ce système le principe actif est encapsulé dans un compartiment réservoir, la formulation médicamenteuse peut être à l'état d'une solution, suspension ou solide. La libération de principe actif est assurée par la membrane d'encapsulation ayant une perméabilité spécifique, cette encapsulation est réalisée par différentes techniques, revêtement par pulvérisation ou par micro-encapsulation [33].

➤ Système de matrice

Dans un tel système le principe actif est dispersé d'une manière homogène dans une matrice qui contrôle la vitesse de libération le produit final peut être sous formes de microparticule gonflable ou des comprimés classiques, la libération du principe actif au niveau du site de dissolution se fait par diffusion suite au gonflement à la périphérie de la matrice accompagnée par un phénomène de dissolution/érosion [33].

Dans des systèmes à base d'alginate de sodium avec le chlorure de calcium le gradient de la pression osmotique qui existe le gel d'alginate et l'environnement constitue un facteur important dans le processus de gonflement. Dans des conditions acides le gonflement de la microparticule d'alginate de calcium se produit rarement, la libération de médicament se fait par diffusion à travers la matrice insoluble. Dans des conditions neutres cette dernière gonfle et la libération dépend du phénomène de gonflement et d'érosion [33].

4.5 Application de l'alginate dans les systèmes de délivrance des biomolécules

L'alginate peut être utilisé comme matrice pour le piégeage ou la délivrance des biomolécules telles que l'ADN, des protéines et des cellules, le processus de gélification doit être doux, sans l'usage des solvants organiques pour conserver la structure tridimensionnelle de ces biomolécules. La libération se fait par diffusion avec une vitesse qui peut être contrôlée par revêtement des microparticules de l'alginate [33].

La biocompatibilité et l'immunogénicité de l'alginate varie en fonction de rapport M/G et en fonction de présence des impuretés mutagènes. Cependant l'alginate riche en G plus que M

est plus biocompatible, d'autres facteurs tels que la taille et la forme des microparticules, la composition et la viscosité de la membrane influence sur l'immunogénicité de l'alginate. La polarité de quelque type de protéines peut entrer en compétition avec le calcium pour les sites de l'acide carboxylique disponible sur l'alginate ce qui entraîne la réduction de taux de diffusion où conduit à l'inactivation de la protéine. Il est donc nécessaire d'ajouter des additifs (acide polyacrylique) qui protège l'agent actif de l'alginate [33].

En plus de son usage pour la véhiculassions des biomolécules dans le tractus gastro-intestinale, l'alginate grâce à sa propriété mucoadhésive peut être utilisé en tant véhicule potentiel de délivrance des biomolécules dans les tissus muqueux [33].

Chapitre II : Formulation d'émulsions et procédés de gélification

1 Définition d'une émulsion

Une émulsion est un mélange de deux solutions non miscibles (une phase hydrophile et une lipophile) dont l'une est dispersée dans l'autre (figure 9), le liquide formant des gouttelettes c'est la phase dispersée (phase discontinue), alors que le second liquide est la phase dispersante (phase continue). Les émulsions faisant partie des colloïdes, la dimension des gouttelettes est située entre le micromètre et le nanomètre [34].

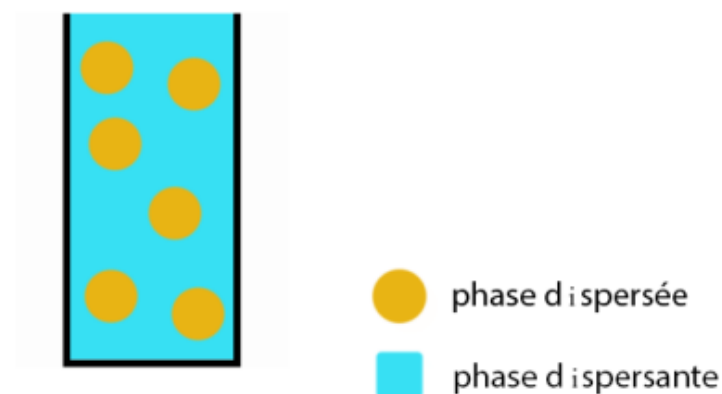


Figure 9 : Représentation schématique d'une émulsion.

L'aspect d'une émulsion est homogène macroscopiquement mais au niveau microscopique on marque une hétérogénéité. La tension interfaciale Lorsque cette force est faible, l'énergie nécessaire pour augmenter la surface des gouttelettes est aussi faible. L'émulsion est alors plus stable car on favorise la séparation des phases [34].

2 Types d'émulsions

Ils existent deux types d'émulsion, directe (notée H/E pour Huile dans Eau) dont une phase lipophile est dispersée dans une phase hydrophile (phase dispersante). Au contraire une émulsion inverse (notée E/H pour Eau dans Huile) dont une phase hydrophile est dispersée dans une phase lipophile (phase dispersante) comme le montre la figure 10 [34].



Figure 10 : Représentations schématiques d'une émulsion directe et inverse (en bleu l'eau, en jaune l'huile.

3 Composition d'une émulsion

3.1 Tensioactif

Un tensioactif (aussi appelé surfactant ou agent de surface) est une molécule modifiant la tension interfaciale entre deux phases. Généralement, un tensioactif est une molécule amphiphile, c'est à dire possédant à la fois une partie hydrophile polaire et une autre hydrophobe apolaire, on utilise ces tensioactifs afin de lier deux phases non miscibles. Le tensioactif est le constituant clé, sans lui, il est impossible de former une émulsion. Grâce à la "tête" hydrophile et à la "queue" hydrophobe (figure 11), le tensioactif a une affinité avec les phases hydrophiles et les phases non hydrophiles (lipophiles par exemple). Il se place donc à l'interface de ces deux phases et permet de faire chuter la tension interfaciale [35].

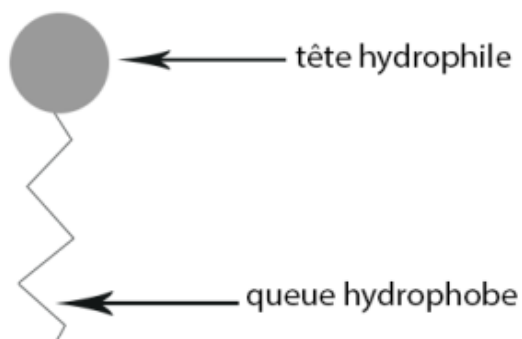


Figure 11 : Schéma structural d'un tensioactif.

La loi de Bancroft définit la phase continue comme la phase dans laquelle le tensioactif est le plus soluble. Ainsi si le tensioactif est hydrophile, on obtiendra une émulsion directe et si au contraire le tensioactif est lipophile, l'émulsion sera inverse [36].

3.2 Différents types de molécules tensioactives

Les tensioactifs peuvent être : soit des petites molécules (phospholipides, monoglycérides, diglycérides,) soit des molécules de tailles plus importantes, comme des protéines (caséine du lait par exemple). Il existe de nombreuses molécules tensioactives très différentes les unes des autres. On peut classer ces molécules en fonction de la charge de la tête hydrophile ou selon la balance HLB montré dans la figure 12 [37] :

$$HLB = 7 + \sum A + \sum B$$

A : Valeurs associées aux groupes hydrophiles

B : Valeurs associées aux groupes hydrophobes

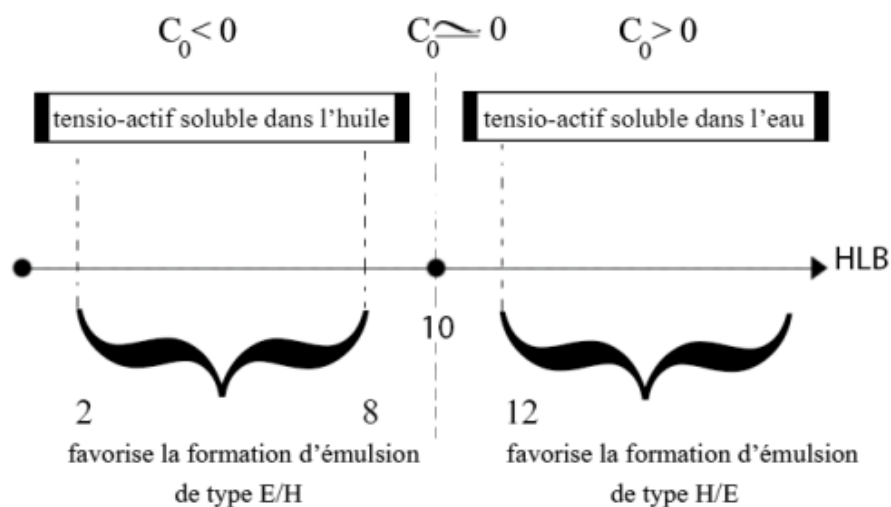


Figure 12 : Propriétés du tensio-actif en fonction de son HLB [37].

4 Démarche à suivre pour la formulation d'une émulsion

- Préparation de la phase aqueuse : Mélange de tous les composants aqueux de l'émulsion avec l'eau.
- Préparation de la phase huileuse : Mélange de tous les composants gras de l'émulsion.
- Incorporation du (des) tensioactif(s) hydrophile(s) dans la phase aqueuse et/ou incorporation du (des) tensioactif(s) lipophile(s) dans la phase huileuse.

- Mélange des deux phases dans un pot en plastique.
- Cisaillement par un appareil de cisaillement à 13000 tours par minutes pendant 10 minutes.
- On considère, pour toutes les expériences, que la température après formation de l'émulsion reste constante.
- La solubilisation des agents tensioactifs se fait à une température de 70°C au bain-marie [34].

5 Procédés de gélification

5.1 Gélification ionotropique

La forme de la microparticule a une influence capitale sur les caractéristiques biopharmaceutiques de la forme médicamenteuse finale. Durant la gélification ionotropique, le changement des paramètres de traitement (comme la concentration du CaCl_2 , le temps de durcissement, la méthode de séchage) influe la forme de cette dernière d'où la modification de son incorporation dans la forme plus complexe du médicament [38].

La modification des paramètres de traitement permet d'optimiser la forme et la morphologie des microparticules [38].

5.1.1 Principe

La gélification ionotropique avec l'alginate de sodium est basée sur la capacité de l'alginate à former un gel avec les ions multivalent (Ca^{+2}) présents dans la solution de durcissement (figure 13). Pour avoir des microparticules la dispersion est ajoutée goutte à goutte dans la solution de durcissement [38].

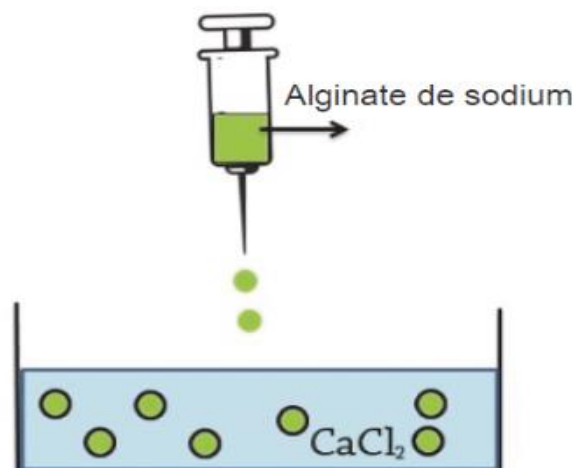


Figure 13 : Procédé de gélification ionotrope (goutte à goutte).

Au contact de la goutte (alginate matière à encapsuler) avec les ions divalents, on obtient des microparticules de gel contenant la matière à encapsuler. La taille de cette sphère dépend de la taille des gouttelettes et de la viscosité de la dispersion ainsi que le diamètre de la buse d'où la goutte sort [38].

Les particules préparées par gélification ionotrope dépendent des paramètres de formulation, de la concentration des solutions et du traitement des sphères. La forme sphérique est toujours obtenue par gélification ionotrope. Cependant, la vitesse d'agitation de la solution de durcissement ainsi que la distance entre la surface cette dernière et l'aiguille à travers laquelle la goutte sort influe la forme de la goutte. Une fois les sphères formées leur séchage également joue un rôle important dans leurs formes. Le changement des paramètres étudiés auparavant modifie la taille de la particule et sa forme donc la teneur de la matière contenue à l'intérieur, d'où l'importance du contrôle rigoureux de ces paramètres [38].

5.2 Gélification interne - émulsification

Dans la méthode d'émulsification, des gels d'alginate sont formés dans une phase continue non aqueuse. La solution d'alginate est dispersée dans un bain d'huile et homogénéisée par agitation afin de produire une émulsion eau dans l'huile (figure 14).

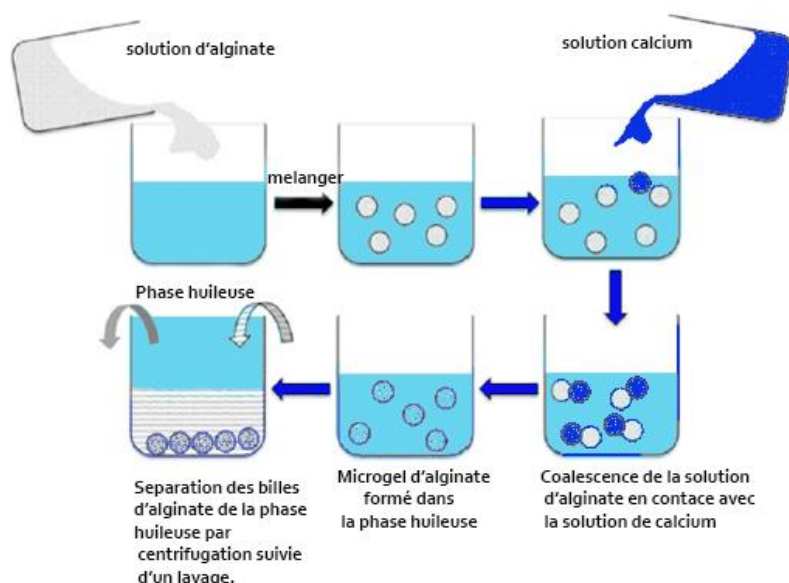


Figure 14 : Procédure de réticulation.

La solution réticulante est introduite lentement dans l'émulsion formant ainsi les gouttelettes [39].

On sépare les microparticules d'alginate de la phase huileuse en procédant à une centrifugation du mélange suivi d'une étape de lavage avec des solvants pour éliminer l'excès d'huile. Au terme de cette technique, on procède à un séchage [40].

La distribution granulométrique et le diamètre des particules d'alginate sont influencés par divers facteurs [41].

L'encapsulation du médicament dans les microparticules d'alginate via une méthode d'émulsification / gélification implique de nombreuses variables de formulation et de conditions de fonctionnement afin d'obtenir les produits souhaités. En effet, La taille des particules est un paramètre crucial pour la sécurité des patients, car ces caractéristiques vont potentiellement influencer l'introduction du produit dans l'organisme, sa biodisponibilité, sa cinétique de libération ainsi que son efficacité thérapeutique [38].

6 Paramètres de formulation des microparticules d'alginate

Il est essentiel d'acquérir une compréhension approfondie des effets des paramètres de formulation cité ci-dessous :

6.1 Choix du polymère

Les polymères préparés à partir de ressources naturelles renouvelables prennent plus d'importance en raison de leur intérêt économique, de leur disponibilité, de leurs propriétés physico chimiques (solubilité dans l'eau, biodégradabilité) et surtout leur capacité à former des gels [42].

L'agar et l'agarose sont utilisés pour la solidification des milieux, cependant ils présentent des inconvénients majeurs comme l'approvisionnement difficile dû à l'instabilité du produit, et le coût élevé en raison des ressources limitées des espèces d'algues dont elles sont isolées [42]. L'utilisation de la carraghénine comme substitut a été proposée mais sa qualité microbiologique limite son utilisation [42].

En ajoutant à cela pour les gels de carraghénine la nécessité de niveau élevé de potassium rendant ce dernier incompatible dans les applications médicales [43].

Par conséquent, l'alginate est devenu le polymère d'encapsulation le plus utilisé pour le matériel biologique y compris les cellules végétales et animales [44, 45], levures et bactéries [46, 47], même les protéines comme l'insuline [48], et les produits alimentaires.

L'alginate permet la formation de gels réversibles stables en présence de cations multivalents dans les conditions de formulation douces à température ambiante. Le polymère est peu coûteux et disponible en plus de ses propriétés permettant le piégeage d'encapsulant de diverses natures [45].

6.2 Choix de l'agent gélifiant

Différents sels de calcium peuvent être utilisés : oxalate, tartrate, phosphate, citrate et carbonate. Certaines études ont montré que les microparticules n'étaient pas formées avec l'oxalate ainsi que le tartrate de calcium [49].

L'utilisation du phosphate de calcium provoquait la formation de particules de grande taille, ce qui était problématique [49, 50]. Il y a également une gélification incomplète des microparticules provoquant ainsi leur agglomération [49].

Par ailleurs, l'utilisation du citrate de calcium engendrait la formation de grosses formes avec une variabilité dans la distribution de taille. Les microparticules obtenues avec du carbonate de calcium étaient sphériques et stables avec une distribution homogène de taille [49].

La suspension alginate- calcium est restée stable à différentes gammes de pH. Le rapport calcium sur alginate égale à ¼ semble assurer une forte formation de particules [49, 51].

6.3 Choix de la phase huileuse

La phase huileuse est composée généralement d'une huile végétale ou minérale dont la viscosité est appropriée afin de contrôler la taille de la dispersion des gouttelettes. L'huile de tournesol présente des avantages majeurs, la disponibilité, le faible coût économique ainsi que la viscosité appropriée pour produire les microparticules de taille requise.

Le rapport eau/huile est choisie en fonction de l'application, il est généralement compris en 1 :1 et 1 :5 [52, 53].

6.4 Choix de l'acide

Le phénomène de réticulation se produit lorsqu'on ajoute la solution réticulante à l'émulsion tout en agitant la solution pour un moment. Cette solution est composée d'huile contenant un acide organique soluble dans l'huile qui a pour rôle de libérer les ions Ca^{2+} [54].

Le choix d'un acide organique soluble dans l'huile approprié est important. Une grande variété d'acides organiques solubles dans l'huile peut être utilisé, mais les acides généralement sélectionnés sont les acides acétique, citrique et lactique dont lesquels, l'acide acétique est préféré [52].

Cet acide organique oléosoluble est initialement ajouté dans l'huile ce qui a pour effet de se répartir immédiatement dans la phase aqueuse déclenchant une gélification rapide, cela en abaissant instantanément le pH de la gouttelette dispersée ce qui solubilise le calcium cristallin [52].

Deux réactions consécutives se produisent après la diffusion de l'acide soluble dans l'huile à travers l'interface huile-eau. Les protons diffusant dans la phase de gel aqueux rencontrent des microcristaux de calcium uniformément dispersés, généralement CaCO_3 , les ions calcium sont libérés instantanément et les gels d'alginate in situ, formant un réseau de gel homogène [55].

6.5 Choix du tensioactif

Dans les processus d'émulsification / gélification et d'extrusion, les tensioactifs jouent un rôle crucial dans la formation des microparticules.

Le rôle du surfactant est d'abaisser la tension interfaciale entre les molécules hydrophiles et hydrophobes, conduisant à des émulsions stables et empêchant la coalescence des gouttelettes d'émulsion pour la production de microparticules discrètes [56].

Un moyen efficace de choisir l'émulsifiant approprié consiste à utiliser un indicateur d'équilibre hydrophile-lipophile (HLB). Les émulsifiants avec HLB dans la gamme de 8 à 18 sont hydrophiles et par conséquent, ils conviennent pour une émulsion huile dans eau. Alors que l'eau dans les émulsifiants d'huile où les valeurs HLB allant de 3,5 à 6 est connu sous le nom de tensioactifs lipophiles comme cité précédemment [57].

L'émulsifiant contient un groupe lipophile (queue) et un groupe hydrophile (tête). Ainsi, il est attiré par les composants polaires et non polaires. Lorsqu'un tensioactif lipophile a été ajouté une émulsion eau dans huile, les queues non polaires peuvent s'étendre vers l'extérieur dans la phase huileuse, tandis que les groupes de tête polaire restent en contact avec la phase aqueuse [57, 58].

Par conséquent, les gouttelettes sont stables dans l'émulsion et les empêchent de s'agglomérer. De plus, le tensioactif contribue également à modifier et à lisser la surface des microparticules [59].

7 Influence des paramètres de formulations sur les propriétés des microparticules

7.1 Concentration en alginate de sodium

La concentration fait partie des facteurs les plus importants qui impactent et modifient les caractéristiques des microparticules d'alginate, tel que la morphologie, la taille ainsi que l'efficacité d'encapsulation du principe actif [60-63].

L'augmentation de la concentration en alginate induit l'augmentation de la viscosité de la solution d'alginate, ce qui augmente la tension interfaciale entre la phase huileuse et les gouttelettes d'alginate, d'où la formation de plus grosses gouttes [62, 64].

Dans l'étude de Shukla et al, des microcapsules d'alginate chargées de furoate de diloxanide (DF) ont été préparé par une méthode d'émulsification/gélification (gélification interne). Les résultats ont montré une augmentation de la taille des microparticules de 417,8µm à 453,9µm lors du passage de la concentration en alginate de 3% à 5% (p/v), respectivement [62].

L'élévation de la concentration d'alginate conduit à une solution plus visqueuse, ce qui engendre la formation de gouttelettes d'alginate plus volumineuses et donc microparticules plus

grosses (grandes). L'efficacité d'encapsulation a également augmenté de 48,6% à 63,9% avec l'augmentation de la concentration en alginate [62].

Dans une autre étude Silva et al, ont obtenu des microparticules d'alginate contenant de l'insuline par une méthode d'émulsification/gélification (gélification interne). Les résultats ont montré que l'augmentation de la concentration en alginate de 2% à 3% (p/v) conduisait à l'augmentation de la taille moyenne des microparticules d'alginate de 53,0 μ m à 112,2 μ m, respectivement. Par contre, ce n'était pas le cas pour l'efficacité de l'encapsulation [64].

Dans l'étude de Rajinikanth et al, qui ont encapsulé le tartrate de metoprolol dans les microparticules d'alginate par une méthode d'émulsification/gélification (gélification interne), il a été conclu que la taille des particules augmentait de 55,3 μ m à 84,5 μ m avec l'augmentation de la concentration d'alginate de 2% à 6% (p/v), respectivement [65].

Dans ce qui suit, le tableau N°4 rassemble les données des travaux précédemment évoqués. On peut dire que la taille des microsphères d'alginate et l'EE augmentent avec l'augmentation de la concentration en alginate.

Tableau 4 : Effet de la concentration d'alginate sur la taille moyenne des microparticules et l'EE du médicament des microparticules d'alginate.

Principe actif encapsulé	Concentration en alginate (p/v)%	Taille moyenne des particules μ m	Efficacité d'encapsulation %
furoate de diloxanide (DF)	3	417,8	48,6
	5	453,9	63,9
Insuline	2	53,0	75,8
	3	112,2	77,9
tartrate de metoprolol	2	55,3	
	6	84,5	

7.2 Concentration du réticulant

Comme cité auparavant, les cations divalents Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} sont considérés comme agent de réticulation pour la formation des microparticules d'alginate. Cependant le strontium et le baryum sont légèrement toxiques alors que les ions Ca^{2+} ne le sont pas, c'est pour cela qu'ils sont les plus utilisés dans la réticulation des solution d'alginate sous forme de CaCl_2 , Ca-EDTA ou de CaCO_3 [66, 67].

Dans l'étude de Y. Baimark et Y. Srisuwan [68], des microparticules d'alginate chargées de bleu de dextrane ont été obtenus par une méthode d'émulsification /gélification (interne).

La taille moyenne des particules a également légèrement diminué de 123µm à 110µm avec l'augmentation de la concentration du Ca^{2+} de 2,5% à 10% (p/v), respectivement, ceci est due au faible gonflement de l'alginate durant le processus de gélification provoqué par l'élévation de la réticulation [68].

Dans une autre étude Rastogi et al [40] ont préparé des microparticules d'alginate chargées d'isoniazide par la méthode émulsification/gélification. Il a été constaté que l'augmentation de la concentration en ions Ca^{2+} au-delà de 7,5% conduisait à la diminution de l'efficacité d'encapsulation et cela est peut-être due à la diminution de la taille des microparticules d'alginate [40].

Le tableau 5 nous montre l'effet de la concentration de cet agent réticulant sur la taille moyenne des microparticules d'alginate ainsi que sur l'EE :

Tableau 5 : Effet de la concentration de l'agent réticulant sur la taille moyenne des microparticules d'alginate et l'EE du médicament.

Principe actif encapsulé	Concentration en agent réticulant (p/v)%	Taille moyenne des particules µm	Efficacité d'encapsulation %
Blue dextrane	2,5	123	77
	10	110	82
Isoniazide	7,5	-	79,9
	10	-	50,5
	20	-	44,9

7.3 Phase huileuse

Plusieurs huiles telles que l'huile de paraffine liquide [40, 69], l'huile d'olive [70], soja [71], et tournesol [72, 73] ont été utilisées dans la fabrication de microparticules d'alginate par un processus d'émulsification/gélification.

L'huile de paraffine liquide est la plus utilisée dans la fabrication de microparticules d'alginate. Cependant, l'effet de la phase huileuse sur leurs caractéristiques n'a pas été largement étudié.

On dit que la taille et l'uniformité des microparticules d'alginate est affecté par la viscosité de la phase huileuse.

Dans leur étude, Wang et al [74], ont constaté que les particules obtenues étaient de plus grande taille avec l'utilisation de l'huile d'olive par rapport à l'huile de paraffine liquide. Ceci est expliqué par la viscosité élevée de l'huile d'olive comparé à l'huile de paraffine liquide [74].

7.4 Vitesse d'agitation

La vitesse d'agitation est utilisée pour contrôler la taille des particules et la distribution granulométrique des microparticules polymériques d'alginate.

Généralement, l'augmentation de la vitesse d'agitation permet d'avoir des microparticules polymériques d'alginate plus fines. Ce résultat est dû au fort taux de cisaillement appliqué pour la dispersion de la phase huileuse dans la phase aqueuse de l'émulsion [62, 75].

Dans son étude Ahmed et al. [76], a démontré que la vitesse d'agitation est le paramètre le plus important qui contrôle la taille des microparticules polymériques d'alginate.

Il a été rapporté que la taille des microparticules d'alginate augmente de 100-160µm à 630-890µm en changeant la vitesse d'agitation de 600tr/min à 200tr/min, respectivement. L'augmentation de la vitesse d'agitation entraînait un fort cisaillement qui conduit à un important flux turbulent au sein de l'émulsion, produisant ainsi des gouttelettes de taille plus petites [76].

7.5 Temps de réticulation

Généralement, le temps de réticulation n'a pas d'influence significative sur la morphologie des microparticules d'alginate dans les procédés d'extrusion et d'émulsification/gélification [63, 77].

Cependant la taille des particules de microparticules d'alginate augmente avec l'augmentation du temps de réticulation [63, 78]. Cela peut être dû à l'augmentation de la réticulation entre les ions Ca^{2+} et les unités d'acide guluronique de l'alginate de sodium, induisant ainsi la formation de particules plus grosses.

Dans leur étude [65], ont encapsulé le tartrate de metoprolol dans les microparticules d'alginate par la méthode d'émulsification/gélification. Ils ont constaté que la taille moyenne des microparticules d'alginate augmentait de 55,3% à 74,5% en prolongeant le temps de réticulation de 5 min à 25min, ce qui s'explique par l'allongement du temps de contact entre les

groupements COO^- de l'alginate de sodium et les ions Ca^{2+} , augmentant ainsi la viscosité de la solution de l'alginate de sodium qui conduit à la formation de microparticules d'alginate plus grosses [65].

8 Avantages et inconvénients du procédé de gélification interne

➤ Avantages du procédé de gélification interne

La gélification interne dans la production de microparticules d'alginate a démontré plusieurs avantages.

Le piégeage dans les particules d'alginate est considéré comme un procédé sur et économique avec une bonne stabilité mécanique [79].

On peut contrôler aisément la taille des microparticules d'alginate de quelques nanomètres à quelques millimètres de diamètre et cela en modifiant les conditions dans lesquelles l'émulsion eau dans huile a été produite [51].

Durant la gélification interne, les ions Ca^{2+} sont initialement repartis de manière homogène dans la solution d'alginate ainsi la diffusion des protons dans les gouttelettes pré-gélifiées induira une gélification à partir de la surface produisant ainsi des gouttelettes identiques [80].

De plus, les encapsulants fragiles sont bien protégés dans la gélification interne en raison du faible cisaillement impliqué dans ce procédé [43]. En plus des avantages cités auparavant, aucun réactif ou solvant toxique n'y est nécessaire ce qui permet des applications biologiques et alimentaires [43].

Enfin, la méthode de gélification interne permet la production efficace de grande quantité de microparticules d'alginate à diamètre contrôlé en raison de la possibilité de production à l'échelle industrielle permettant une utilisation vaste de ce procédé [43].

Néanmoins, ce procédé ne serait pas sans inconvénients.

➤ Inconvénients du procédé de gélification interne

Les microparticules produites par gélification externe offre une plus grande résistance à la diffusion contrairement à celle produites par gélification interne [80].

De plus, certaines études ont démontré que le procédé de gélification interne peut provoquer une perte ou inactivation des parties encapsulées de nature protéique pendant les processus de formulation et de lavage [81].

**Chapitre III : Notions
d'encapsulation et
caractérisation des
microparticules
d'alginate**

1 Définition de l'encapsulation

La microencapsulation regroupe l'ensemble des technologies permettant de préparer des microparticules individualisées dont la taille varie de 1 μm à 1 mm, généralement sphériques ou ovoïdales, et constituées d'un matériau polymère qui enrobe jusqu'à 90 % d'une matière active : parfum, arôme, pigment ou colorant... [82].

L'encapsulation nous permet d'obtenir des particules de quelques micromètres μm (de 1 à 100 μm) sous forme de poudre ou de dispersion dans l'eau ou dans un autre liquide [83].

La microencapsulation fait référence à des particules de tailles comprises entre 1 μm et 1 mm tandis que la nanoencapsulation est utilisée pour les particules de tailles nanométriques (figure 15) [83].

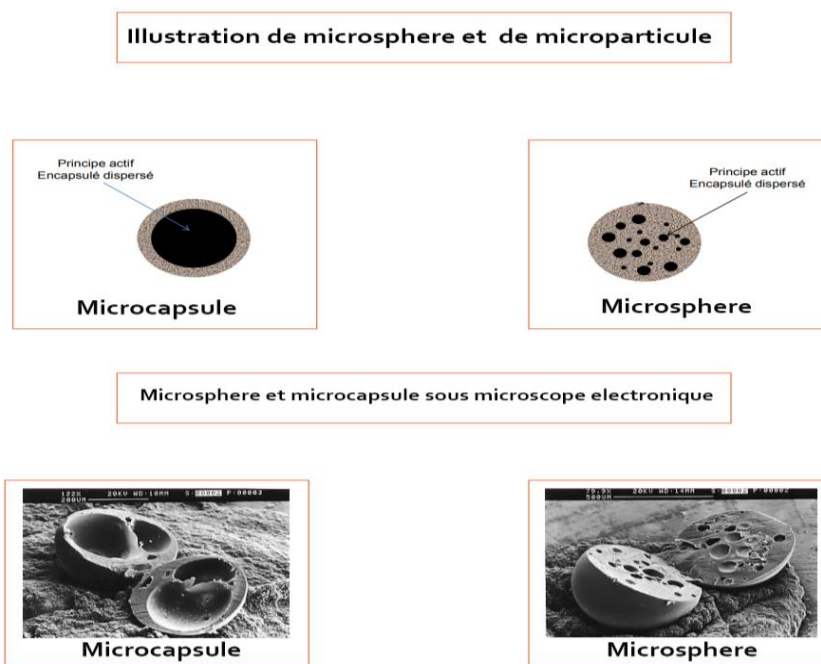


Figure 15 : Différence entre microsphère et microcapsule [84].

Certains procédés d'encapsulation peuvent conduire à la production de microparticules de type microcapsule. Leur structure est constituée d'un noyau de matière active entouré d'une enveloppe continue de matière enrobant. Il s'agit de structures « Réservoir ». D'autres techniques peuvent aboutir à la formation de microparticules. Dans ce cas, la matière enrobante forme un réseau macromoléculaire continu constituant une matrice poreuse dans laquelle les

substances actives vont s'enchâsser sous la forme de fines inclusions de particules solides, de gouttelettes liquides ou de gaz (figure 16) [85].

Enfin, les liposomes sont des structures plus rares (figure 16). Ces vésicules sont composées d'une membrane de lipides, qui peut être unilamellaire (une seule couche lipidique) ou multilamellaire (plusieurs couches lipidiques). Les niosomes ont des structures similaires aux liposomes mais leurs membranes sont constituées de molécules synthétiques amphiphiles [85].

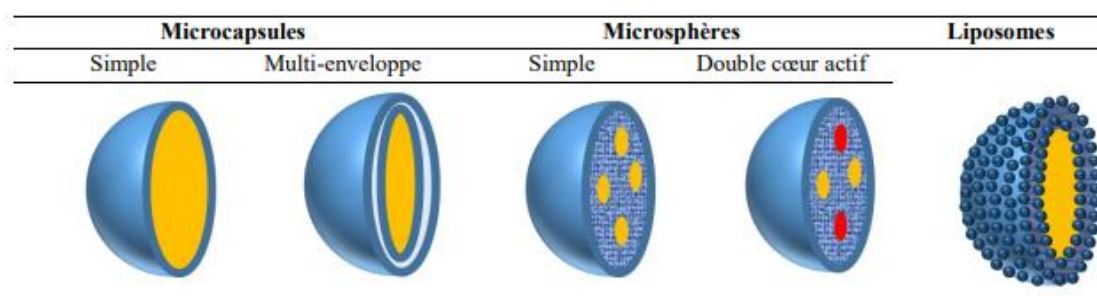


Figure 16 : Exemple de morphologie de particules obtenues par microencapsulation [84].

2 Composés pouvant être encapsulé

- Etat physique : solide, liquide ou gaz
- Hydrophile ou hydrophobe
- Granulométrie (poudre, particule) : jusqu'à quelques mm
- Teneur en actif dans les particules finales : jusqu'à 900 mg/g

3 Matériaux pour l'encapsulation

- Biopolymères (origine végétale, animale ou bactérienne) : alginates, pectines, carraghénanes, ...
- Cires et matières grasses (origine végétale ou animale) : cire de carnauba, stéarines.
- Tensio-actifs : lécithines, Spans®, Tweens®...
- Polymères synthétiques : isocyanates, polyamides, polyuréthanes ...

4 Intérêt de l'encapsulation :

➤ Immobilisation

Cet objectif résulte souvent du désir de vouloir limiter le contact entre certaines parties d'un système. L'immobilisation est souvent utilisée pour des cellules microbiennes.

En effet, leur confinement dans une membrane semi-perméable permet d'obtenir une activité optimale de par une isolation physique du milieu extérieur tout en maintenant un environnement interne adapté pour leur croissance et leur métabolisme [86].

Ce principe a été utilisé pour la commercialisation du complément alimentaire animal Biacton® par la société Bioarmor. En effet, ce produit contient des bactéries encapsulées par des polymères naturels afin d'améliorer la survie bactérienne au cours de l'élaboration de l'aliment et pendant la période de conservation [87].

En outre, l'isolation apportée par l'encapsulation est très souvent utilisée pour des catalyseurs et l'utilisation de composés incompatibles [87].

➤ Protection

Plusieurs matières actives sont fragiles et doivent être protégées du milieu extérieur. L'encapsulation permet leur protection vis-à-vis des contraintes appliquées.

Les vitamines E et C sont très souvent encapsulées car elles sont sensibles à la dégradation par contact avec la lumière, la chaleur ou l'oxygène [88-90].

L'activité protectrice apportée par l'encapsulation est également utilisée dans le domaine médical. Comme exemple, l'encapsulation de bactéries probiotiques, avec de l'alginate et du chitosane, apporte une protection vis-à-vis des conditions gastrointestinales et donc permet une libération de cellules bactériennes viables dans le colon [91].

Il est également possible de citer l'amélioration du diagnostic grâce à la protection amenée par l'encapsulation illustrée par les travaux de F.P, Navarro et al. [92] qui ont reporté une amélioration des propriétés optiques grâce à l'encapsulation au sein de nanoparticules lipidiques du vert d'indocyanine qui est un agent contrastant [92].

➤ Contrôle de la libération

Dans la majorité des cas, le but de l'encapsulation est d'établir un profil de libération spécifique.

Par exemple, dans le domaine médical le traitement (oncoLAR) permet la libération d'un agent anti-cancéreux progressif sur une période de 1 à 3 mois [93].

De même, G.L. Plosker et al. [94], ont démontré que le médicament (Lupron Depot), traitant le cancer de la prostate, permet d'obtenir une libération contrôlée à un taux journalier de 2,8% pendant un mois après une administration sous-cutanée ou intramusculaire.

5 Procédés de microencapsulation

Selon le domaine voulu de l'encapsulation, la nature du polymère utilisé, les propriétés de la molécule encapsulée et la structure souhaitée des particules ; un procédé d'encapsulation est choisi. A chaque technique correspondent un intervalle de tailles ainsi qu'un taux d'encapsulation et une structure interne [95].

La classification des techniques d'encapsulation disponibles la plus répandue s'intéresse principalement au principe même du procédé et des fois au milieu dispersant [15] :

➤ Les procédés mécaniques

Basés sur le séchage ou la solidification de gouttelettes contenant tous les constituants de la future particule.

➤ Les procédés chimiques

Sont caractérisés par un déclenchement simultané de la synthèse de la membrane (ou de la matrice) et de l'encapsulation du principe actif. Les procédés chimiques n'utilisent donc pas de matrices enrobantes préformées.

➤ Les procédés physico-chimiques

Ils sont dépendants de la solubilité des agents enrobants sous l'effet de variation des conditions physiques (température, pH, ajout d'un non solvant ou d'un polymère incompatible...), et du changement d'état (fusion et solidification) des agents enrobants.

6 Domaines d'application

La microencapsulation est une technique utilisée dans de nombreuses applications industrielles et dans des domaines très variés.

Parmi ces domaines on peut citer :

➤ **Domaine pharmaceutique**

Le rôle principal de la conception des microcapsules est principalement de contrôler la durée de la libération du principe actif, améliorer la biodisponibilité et la stabilité des médicaments et cibler des sites spécifiques du corps [96].

Elles sont souvent utilisées soit par voie orale ou par injection intra musculaire [97].

Ces microparticules 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 [98].

Les formes posologiques orales sont souvent préparées avec emploi d'une « barrière » chimique ou physique pour assurer une libération contrôlée du médicament. Pour ce faire, un noyau contenant l'ingrédient actif ou l'incorporation de l'ingrédient actif se fait par enrobage dans une matrice polymérique. Les hydrocolloïdes comme l'alginate peuvent jouer un rôle important dans la conception d'un produit à libération contrôlée. La molécule d'alginate subira une hydratation presque immédiate pour créer une couche hydrocolloïdale de haute viscosité [99].

➤ **Domaine biomédical**

L'encapsulation dans les hydrogels est l'une des stratégies utilisées dans l'immuno-isolation pour séparer les cellules vivantes de leur environnement, en cas de greffe par exemple. La formation de structures tridimensionnelles qui peuvent contenir de grandes quantités d'eau est compatible avec la survie des cellules encapsules à l'intérieur du gel [100].

La technologie de microencapsulation est aussi utilisée pour l'immobilisation de cellules animales, végétale ou de microorganismes. La membrane permet la perfusion sélective des milieux nutritionnels vers l'intérieur des microcapsules mais empêche de grandes molécules toxiques de passer. D'un autre côté, les sécrétions des cellules peuvent traverser cette membrane semi-perméable [101].

➤ **Domaine textile**

Des tissus contenant des microcapsules à base de paraffine permettent d'ajuster automatiquement la température en fonction de la chaleur du corps humain.

Les microcapsules peuvent aussi rendre des textiles hydratants, désinfectants, parfumés [98].

➤ **Domaine cosmétique**

Afin de prolonger la stabilité chimique et microbiologique du principe actif, les microcapsules sont souvent intégrées dans différentes crèmes, shampooings, ou gels [102].

➤ **Domaine agro-alimentaire**

Dans le domaine agro-alimentaire, La microencapsulation permettra de garder le parfum, de prolonger la durée de conservation et d'ajuster la saveur alimentaire. Elle est principalement utilisée pour des additifs alimentaires, tels que les arômes, les édulcorants...etc [102].

7 Evaluation in vitro des performances des microparticules d'alginate

Afin de valider ou non nos formulations, le comportement des microparticules d'alginate a été étudié et évalué et cela en appréciant la cinétique de libération du principe actif dans les milieux physiologiques simulés.

Pour ce faire, un test de dissolution a été effectué en plongeant les billes d'alginate dans deux milieux différents, le premier étant acide de $\text{pH} = 1.2$, simulant le milieu gastrique physiologique (SGF) puis un deuxième milieu basique généralement de $\text{pH} = 6.8$, simulant quant à lui le milieu intestinal (SIF). Ce test se déroule à une température de $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ et une agitation de 100 trs/min.

8 Caractérisation physico chimique des microparticules d'alginate

➤ **Aspect macroscopique**

L'aspect macroscopique (visuel) obtenu des différentes formulations est une caractéristique importante pour vérifier l'aspect et la couleur des échantillons préparés. Elles sont analysées à l'état humide et après séchage [103].

➤ **Aspect microscopique**

Après avoir étaler les microparticules soigneusement sur une lame de verre, nous les avons observées directement au microscope optique binoculaire après séchage. Cette analyse est effectuée pour l'ensemble des essais de formulation pour un nombre donné de microparticules et ce en utilisant un grossissement de 10x40 [103].

8.1 Efficacité d'encapsulation

Le principe actif contenu dans les microparticules est caractérisé par :

➤ **Le taux d'encapsulation[104]**

$$Teneur\ en\ principe\ actif = \frac{m(principe\ actif\ encapsulé)(g)}{m(particules)(g)} \times 100$$

➤ **L'efficacité d'encapsulation (EE)**

Assi appelé le taux d'encapsulation, elle représente le pourcentage du PA présent dans les microparticules (masse du principe actif encapsulé) par rapport à celle introduite initialement [104] :

$$Efficacité\ d'encapsulation(EE) = \frac{m(principe\ actif\ encapsulé)(g)}{m(principe\ actif\ introduit)(g)} \times 100$$

La masse de la matière active encapsulée peut être mesurée en appliquant le test de dissolution cité auparavant. A la fin du test, l'échantillon est analysé à la longueur d'onde qui correspond au maximum d'absorption du principe actif [97, 105].

Du fait de leur structuration, la teneur en principe actif encapsulé peut être très élevée dans les microcapsules, de l'ordre de 85 à 90 % (rapport massique). Celles rencontrées dans les microparticules sont plus faibles, de l'ordre de 20 à 35 % au maximum [104].

8.2 Spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie UV-Visible se réalise à l'aide d'un spectrophotomètre. Lorsque la cuve contenant la solution est placée dans un spectroscopie, elle reçoit un rayonnement d'intensité I_0 . Une partie de cette lumière incidente notée (I_0) est absorbée par le milieu et le reste, noté I , est transmis. L'intensité 3 (I) du rayonnement issu de la cuve est donc inférieure à l'intensité du rayonnement initial (I_0). La fraction de la lumière incidente absorbée par une substance de concentration C contenue dans une cuve de longueur l est donnée par la loi de Beer-Lambert :

$$A = \log (I_0/I) = \epsilon l C$$

L'analyse quantitative par la spectrométrie UV-visible est très employée (beaucoup plus que l'analyse qualitative) grâce à l'utilisation de la loi de Beer-Lambert. Comme applications, on peut citer :

- Dosage du fer dans l'eau ou dans un médicament.
- Dosage des molécules actives dans une préparation pharmaceutique [106].

Partie pratique

Dans l'intérêt d'une encapsulation, nous allons étudier la possibilité de concevoir et de préparer des microparticules à base d'alginate de sodium contenant du fénofibrate par la technique de gélification interne.

Cependant, la réussite thérapeutique de ce traitement dépend de sa biodisponibilité étant donné sa faible solubilité dans l'eau et par conséquent de la solubilité du principe actif en milieux gastro-intestinal simulés, conduisant à un faible taux de dissolution et une faible absorption. L'efficacité thérapeutique pouvant alors être limitée par une étroite fenêtre d'absorption dans le tractus gastro-intestinal comme c'est le cas pour de nombreux principes actifs qui voient leur absorption limitée au début de l'intestin grêle.

Le principal défi que nous nous sommes lancé est de pouvoir véhiculer le fénofibrate jusqu'au niveau intestinal en modulant la forme galénique et promouvoir ses propriétés de libération et de dissolution.

Cette partie expérimentale se passe par deux volets :

- le premier volet englobe les essais de préformulation (d'orientation) dans le but de fixer le domaine expérimental dans lequel nous lanceront nos formulations en vue d'obtenir la formule optimale. Ces essais consistent à la préparation des phases aqueuse, huileuse et de réticulation en variant certains paramètres tout en s'appuyant sur des données littéraires.

Les microparticules obtenues sont caractérisées par leurs morphologies et le taux d'humidité. Suite à cela, une marge de concentration des composés de chacune des phases est choisie selon des critères de sélection.

- Le deuxième volet s'appuie sur les précédents essais, dont l'objectif principal est de dégager le meilleur protocole expérimental et d'évaluer les résultats, en prenant compte la morphologie des particules obtenues, leurs taux d'encapsulation ainsi que leur aptitude à libérer la substance active par le biais des essais de dissolution en milieux gastriques simulés. Ces paramètres sont la concentration du polymère, de la solution de réticulation, du CaCO_3 et la vitesse d'agitation.

1 Préparation des microparticules polymériques à base d'alginate

1.1 Matériel

1.1.1 Matière première

La préparation des microparticules a nécessité l'utilisation d'un panel de matières premières citées dans le tableau 6 :

Tableau 6 : Matières utilisées dans la formulation des microparticules d'alginate.

	Formule	Fabriqueur	Masse molaire g/mol	Numéro de Cas
Alginate de sodium	$C_6H_7NaO_6$	Biochem Chemopharma	$198,1059 \pm 0,0071$	9005-38-3
Carbonate de calcium	$CaCO_3$	SIGMA-ALDRICH	100.0869	471-34-1
Hydroxyde de sodium	NaOH	SIGMA-ALDRICH	39.997	1310-73-2
Chlorure de calcium	$CaCl_2$	Riedel-dehaën	110.98	10043-52-4
Acide acétique	CH_3COOH	SIGMA-ALDRICH	60.05	64-19-7 818755
Span 80	X	FLURKA	1310	1338-43-8
Tween 80	X	SIGMA-ALDRICH	1310	9005-65-6
Huile de tournesol	X	Fluriale/cévital	282.4614 ± 0.0174	8001-21-6
Acide chlorhydrique	HCl	SIGMA-ALDRICH	36.458	7647-01-0
Phosphate monopotassique	KH_2PO_4	SIGMA-ALDRICH	136.086	7778-77-0
Acétate de sodium anhydre	$C_2H_3NaO_2$	SIGMA-ALDRICH	82.0343	127-09-3
Chlorure de sodium	NaCl	SIGMA-ALDRICH	58.44	7647-14-5
Ethanol	CH_3CH_2OH	SIGMA-ALDRICH	46,07	64-17-5

1.1.2 Consommable

La liste de la verrerie et des accessoires utilisés est la suivante :

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Bêchers de capacité : 30 ml, 100 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml. - Eprouvettes de 50 ml, 100 ml, 1000 ml. - Fioles jaugées de 1000 ml, 50 ml. - Pipettes de 5ml, 10ml. - Filtre-seringues, Barreaux magnétiques. | <ul style="list-style-type: none"> - Tubes à essais et boîtes de pétri. - Lames et lamelles. - Seringues de 5 cc, 2.5 cc. - Papier filtre. - Micropipette. - Para-film et papier absorbant |
|--|--|

1.1.3 Equipement

La liste des équipements est énumérée dans le tableau 7 :

Tableau 7 : Equipements utilisés dans la préparation des microparticules d'alginate.

Appareil	Marque
Microscope a caméra	OPTIKA (4083-B5, DIGITAL CAMERA)
Microscope optique	Leica
Dissolutest	SOTAX
pH mètre	FiveEasy Plus
Agitateur magnétique	Stuart SB162
Agitateur à hélice	DIAB OS40-Pro
Dessiccateur	METTLER TOLEDO HB43-S Halogen
Pompe à vide	Vakuumumpe
Lyophilisateur	Christ®
Balance	KERN PLT 2000-3DM
Etuve	Memmert
Centrifugeuse	Hettich
Spectrophotomètre	Biotech Engineering Management Co. Ltd.

1.2 Procédés et méthodes

Différentes méthodes sont utilisées pour la formation des microparticules d'alginate. Dans notre travail, nous avons procédé à la préparation de ces microparticules par gélification interne. Néanmoins pour avoir un résultat satisfaisant, des essais sont nécessaires au préalable et cela pour optimiser au maximum les conditions de travail et le protocole opératoire.

Afin d'obtenir les particules les plus régulières et homogènes possible, plusieurs essais sont effectués et cela en variant différents paramètres à chaque fois tout en se référant aux travaux antérieures. La préparation des microparticules a nécessité l'utilisation du procédé de gélification interne qui consiste en une préparation d'une émulsion eau dans l'huile dans laquelle la phase aqueuse contient l'alginate et l'agent réticulant (CaCO_3), tandis que la phase huileuse est formée du tensioactif et de l'acide acétique. Le choix de ce procédé repose sur l'efficacité de la méthode ainsi que la disponibilité du matériel au niveau du laboratoire [30, 51].

La gélification interne dans la production de microparticules d'alginate a démontré plusieurs avantages. Parmi eux, la taille peut être contrôlée facilement et cela sans l'ajout de solvant toxique, ce qui permet des applications biologiques et alimentaires à moindre coûts [43, 64], [51, 79, 80]

Cette méthode de préparation permet également d'obtenir des microparticules capables d'encapsuler de la matière active. Pour toutes ces raisons, nous l'avons adopté dans notre travail [107-109].

Elle se déroule en plusieurs étapes en commençant par une phase d'émulsification. Dans notre travail, on procède à la préparation d'une émulsion inverse Eau dans Huile. Les émulsions eau dans huile sont des systèmes colloïdaux ayant des gouttelettes d'eau dispersées dans l'huile. Par conséquent, l'huile agit comme la phase continue de ce colloïde alors que l'eau est la phase dispersée. L'huile ne se mélange pas à l'eau dans des conditions normales. Mais avec un bon mélange et en utilisant des agents stabilisants (tensioactifs), nous pouvons obtenir une émulsion eau dans l'huile. L'efficacité de ce système augmente avec la réduction de la taille des gouttelettes d'eau dispersées. En effet, il y'a augmentation de la biodisponibilité des produits pharmaceutiques, ainsi que la durée de conservation des aliments et des boissons [107-109].

De plus, la nature chimique des émulsions eau dans huile le rend très important dans la production de produits pharmaceutiques à base d'huile. Contrairement aux émulsions huile

dans eau, ces émulsions ne nécessitent qu'un seul émulsifiant. Ex : stéarate de sorbitane, lécithine, alcools de lanoline / lanoline et monooléate de glycéryle [107-109].

1.3 Rapport de phases

Dans notre étude, l'émulsification a été réalisé avec deux rapports de phases aqueuse/huileuse. Des rapports de 30/70 % (p/p) et 50/50 % (p/p) ont été choisi pour étudier l'impact de ce paramètre sur les caractéristiques des microparticules [52, 53].

Seul le rapport qui garantit un résultat optimal sera retenu pour les essais futurs d'optimisation. Ces résultats seront également appréciés en fonction du taux d'humidité résiduelle ainsi que la taille moyenne des particules formées [52, 53].

1.3.1 Phase aqueuse (alginate, CaCO_3)

Nous avons effectué des essais avec différentes concentrations de solution d'alginate de sodium et de la solution de réticulation CaCO_3 . Selon la littérature, des protocoles variant ces deux paramètres ont été proposé comme dans le tableau 8 :

Tableau 8 : Concentrations des solutions d'alginate et de chlorure de calcium des différents protocoles proposés dans la préparation des microparticules d'alginate.

Protocole	[110]	[39]	[111]	[112]	[113]	[114]	[115]
Concentration de l'alginate de sodium	2%	3%	[2-5]%	[2-2.5]%	[2-3]%	2%	6%
Agent réticulant	5%	Ca/alg=7.3	[2.5-10]%	[1-3]%	1-3	4%	1.3%

A partir de ce tableau nous sommes ressortis avec des intervalles de concentration d'alginate et de CaCO_3 . Les essais préliminaires nous ont permis de définir une zone d'expérimentation qui nous permettra ensuite l'optimisation de la formule.

Les intervalles retenus sont [2-3] % pour l'alginate et [5-7] % pour le CaCO_3 .

1.3.2 Phase huileuse (tensioactifs, huile, NaOH)

Les valeurs des paramètres contenus dans la phase huileuse sont tirées des différentes études effectuées au préalable [76]. L'huile de tournesol contenant 1% de span 80 représente notre phase huileuse. A celle-ci, 10 ml de NaOH à 5 % préparée au préalable est ajoutée juste avant l'émulsification [62]. L'hydroxyde de sodium permet l'obtention d'un gel homogène. Lors de

son ajout l'alginate n'a plus tendance à se déplacer vers la zone de gélification, car la présence d'ions sodium a conduit à un équilibre de charges [3].

1.3.3 Vitesse et temps d'émulsification

La vitesse d'émulsification s'avère un élément très important dans l'aspect de la formulation. En effet une vitesse élevée a tendance à produire une émulsion comportant de fines gouttelettes et ceci s'explique par les forces de cisaillement qui augmentent et conduisent à la formation de gouttelettes de tailles réduites [116]. Tandis qu'une vitesse faible produit une émulsion contenant des gouttelettes de grandes tailles [117, 118].

L'étude menée par S.-F. Lin et autres [117] a signalé que le temps de réticulation ne révélait aucune différence significative en termes de taille moyenne pour des traitements variant de 15, 30 et 60 min. Néanmoins laisser l'agitation longtemps peut engendrer une augmentation de l'épaisseur des microparticules si le calcium est suffisamment élevé dans la solution [119]. Dans notre cas, à partir des protocoles joint dans le tableau 9 ci-dessous, nous avons opté pour une vitesse de rotation variante comme suit : [400-1000] trs/min.

Tableau 9 : Différentes vitesses de rotation des protocoles proposés dans la préparation des microparticules d'alginate.

Protocol	[62]	[120]	[84]	[110]	[76]	[39]	[111]	[113]
Vitesse de rotation (tr/min)	750-1500	200-600	750-1500	200-600	200-600	400	200-1400	1500-2000

1.4 Réticulation

La réticulation se produit en ajoutant la solution réticulante à l'émulsion tout en maintenant l'agitation. Cette solution est composée d'huile contenant un acide organique soluble dans celle-ci qui a pour rôle de libérer les ions Ca^{2+} [51, 52].

Dans notre cas c'est l'acide acétique qui a été choisie. Cet acide organique est initialement ajouté dans l'huile, ce qui a pour effet de se répartir immédiatement dans la phase aqueuse déclenchant une gélification rapide, cela en abaissant instantanément le pH de la gouttelette dispersée ce qui solubilise le calcium cristallin formant un réseau de gel homogène. De plus, l'agitation continue du milieu de gélification assure la formation ininterrompue des microparticules en empêchant leurs l'agrégation [51, 52].

1.5 Lavage

Cette étape est très importante, elle vise à débarrasser toute la préparation de la phase huileuse dispersante, pour pouvoir récupérer toutes les microparticules générées.

Une fois la gélification terminée, les microparticules formées doivent être exemptes de toute huile résiduelle. Afin d'y remédier, une solution de CaCl_2 contenant 1% de Tween 80 a été ajoutée sous agitation, pour éliminer toute trace d'huile et récupérer les microparticules de la phase aqueuse.

On procède à trois lavages successifs avec un tampon acétate de $\text{pH}=4.5$, tout en enlevant à chaque fois l'excès d'huile par aspiration à l'aide d'une seringue.

1.6 Filtration

Afin de récupérer notre matière en vue d'un séchage, on procède à une centrifugation à raison de 1000trs/min pendant 20min suivie d'une filtration de la solution. Pour que celle-ci soit plus rapide et plus efficace, le liquide aqueux résiduel est aspiré à l'aide d'une pompe à vide (on parle alors de filtration sous vide). Dans notre cas on cherche à récupérer le solide, ce qu'on appelle l'essorage du solide.

L'essorage sous vide de notre matière est une étape très importante pour l'obtention de la matière comme le montre la figure 17.

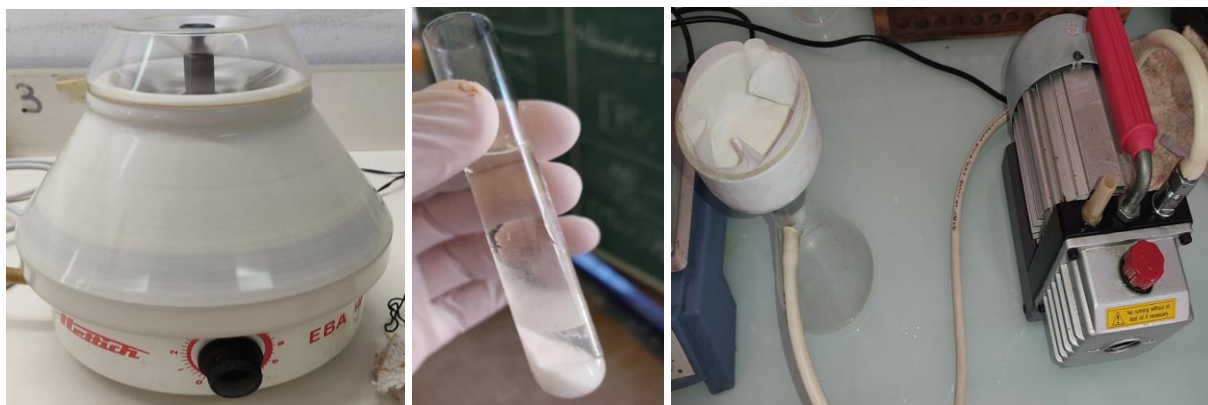


Figure 17 : Centrifugation puis filtration de la matière formulée.

1.7 Séchage

Le séchage est l'étape finale du procédé. Elle a pour but d'éliminer par évaporation le liquide qui est imprégné dans notre matière. Le terme déshydratation a un sens plus étroit et ne concerne que l'élimination de l'eau dans un solide ou dans un liquide.

Il apparait sous de multiples techniques en fonction de la diversité des produits traités.

1.7.1 Séchage à l'air libre

Souvent proposé comme premier mode de séchage, il est économique mais présente tout de même des inconvénients.

1.7.2 Séchage a l'étuve

Alternative au séchage à l'air libre, permet à la matière de sécher dans un espace fermé dont la température est contrôlée (figure 18).

Son intérêt réside dans le gain de temps. Cependant il est plus consommateur d'énergie.



Figure 18 : Etuve de marque Memmert.

1.7.3 Lyophilisation

1.7.3.1 Définition

La lyophilisation, autrefois appelée cryodessiccation, est un procédé de séchage à froid, une dessiccation sous vide, à basse température permettant une déshydratation presque totale du produit concerné, qui doit ensuite être conservé sous vide à température ambiante (figure 19). Le produit lyophilisé peut retrouver ses qualités premières par simple addition d'eau.



Figure 19 : Lyophilisateur Christ®.

1.7.3.2 Principe

La lyophilisation consiste à l'élimination progressive de l'eau présente dans notre matière préalablement congelé (phase solide), par sublimation (passage à la phase vapeur, sans passer par la phase liquide).

1.7.3.3 Avantage de la technique (choix de la technique) :

- Elle permet d'avoir un system poreux qui va permettre la libération du principe actif ;
- Permet l'obtention de produit à une longue durée de conservation ;
- Permet de conserver les propriétés organoleptique et nutritionnelles même pour les composés thermosensibles.

1.7.3.4 Inconvénients de la technique :

- Technique assez couteuse ;
- Consomme de l'énergie.

2 Choix des composants et protocole

La méthode de préparation des microparticules d'encapsulation décrite dans les travaux de Silva et al. [39] a été utilisée et modifiée pour réaliser ce travail.

Le principe de la méthode repose sur la préparation d'une émulsion avec un rapport de phases allant de 30/70 à 50/50 (p/p). Dans l'eau distillée (30 et 50 g), de l'alginate de sodium à 2 et 3 % (p/p) a été dissout sous agitation à 70°C. Une suspension de CaCO_3 à 5% et 7% (p/p) a été ajoutée à la solution d'alginate.

Après homogénéisation de la phase aqueuse, le mélange a été dispersé dans de l'huile de tournesol (rapport de phase interne de 30% et 50%,) contenant 1% (p/p) du tensioactif le Span 80 en agitant à 400 et 1000 trs/min.

Après 15 min d'émulsification, 20 g d'huile de tournesol contenant de l'acide acétique glacial (rapport molaire acide/ Ca^{2+} de 3,5) a été ajouté à l'émulsion en maintenant l'agitation à 400 et 1000 trs/min pendant 10min, pour permettre la solubilisation du carbonate de calcium.

Une fois les 10min écoulées, 50ml de CaCl_2 à 0,05M et 0,1M ont été ajouté à l'émulsion et laissé sous agitation 400trs/min pendant 10min.

Les microparticules ont été récupérées de la phase huileuse en utilisant un tampon acétate à pH 4,5 avec des lavages successifs jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'huile. La matière est alors récupérée et centrifugée à 10000 trs/min pendant 20min, puis le culot a été filtrée sous vide et séché selon différents procédés.

Les variables retenues sont citées dans le tableau 10 :

Tableau 10 : Valeurs des paramètres testés lors des essais.

Variables	Valeurs	
	%	Masse (g)
La concentration du réticulant	5 – 7	1.5 – 3.5g
Concentration de l'alginate	2 – 3	0.6 – 1.5g
Concentration du tensioactif	1	0.5 – 0.7
Rapport interne de phase	30/70 – 50/50 (p/p)	
Rapport molaire acide/Ca	3,5	/
Vitesse de rotation du mélangeur	400 – 1000 trs/min	

3 Essais d'orientation

Bien que la méthode de gélification interne utilisée est reconnue efficace, la formation de microparticules d'alginate de taille et de forme souhaitées nécessite souvent quelques essais au préalable, car si les conditions ne sont pas optimales, des agrégats de particules peuvent être obtenus.

Dans cette partie, nous avons établi un screening des variables influençant le processus, nous avons effectué plus de 20 essais préliminaires en se référant aux différentes variables citées dans le tableau 10.

3.1 Etape 01

Durant l'étape 1, nous avons réalisé 4 essais, deux essais pour chaque rapport de phase. Les valeurs des paramètres de formulation sont citées dans le tableau 11.

Remarque : Chaque formulation a été réalisée deux fois pour s'assurer de la reproductibilité de l'expérience.

Tableau 11 : Paramètres de formulation des essais 1 à 4 de l'étape 01.

N° de l'essai	Rapport de phase	Emulsification					Réticulation		
		Phase aqueuse		Phase huileuse		NaOH (ml)	Temps et vitesse d'émulsification	Acide acétique(g)	Temps et vitesse de réticulation
		CaCO3(g)	Alginate de sodium(g)	Huile(g)	Span80(g)		400 trs/min pdt 15min	0,2	400 tr/min pendant 10min
1-3	30/70	5	1	70	1	sans			
2-4	50/50	7	2	50	1	Sans	1000 trs/min pdt 15min	0,2	1000tr/min pdt 10min

Ces expériences n'ont pas abouti à une réticulation visible avec des microparticules individualisées. Néanmoins, la matière résultante était pâteuse comme le montre la figure 20.

Pour remédier à ce problème, de nouveaux paramètres ont été introduits. Le rapport acide/Ca²⁺ = 3,5 a été retenu ainsi que l'ajout de 10ml de NaOH 5% dans la phase huileuse avant l'étape de réticulation (voir étape 2).



Figure 20 :Aspect de la matière obtenue lors des essais 1, 2, 3 et 4

3.2 Etape 02

Après avoir revu la littérature et modifier le protocole, nous sommes passés à l'étape 2 ou nous avons formulé les essais 5 à 8 détaillés dans le tableau 12 :

Tableau 12 : Paramètres de formulation des essais 5 à 8 de l'étape 02.

N° de l'essai	Rapport de phase	Emulsification						Réticulation			
		Phase aqueuse		Phase huileuse		NaOH (ml)	Temps et vitesse d'émulsification	Acide acétique(g)	Temps et vitesse de réticulation	CaCl ₂ (mol/m)	Tween80 (g)
		CaCO ₃ (g)	Alginate de sodium(g)	Huile(g)	Span80(g)						
5-7	30/70	5	1	70	1	10ml 5%	400 tr/min pdt 15min	2.249	400 tr/min pendant 10min	0,05	1
6-8	50/50	7	2	50	1	10ml 5%	1000 tr/min pdt 15min	7.145	1000tr/min pdt 10min	0,05	1

Essai 5-6-7-8

En respectant le rapport acide acétique/ $\text{CaCO}_3 = 3,5$; la quantité d'acide acétique glacial augmenterait de 0.2 g à 2.249g et 7.145g pour les émulsions 30/70 et 50/50 (% p/p) respectivement, ainsi que l'ajout de 10 ml de NaOH (5%), nous avons pu aboutir à une réticulation. Cependant, après l'ajout de la solution de CaCl_2 à 1% de Tween 80, une fraction des particules réticulées était emprisonnée dans la phase huileuse, ce qui rendait son extraction impossible comme montré dans la figure 21.

Pour remédier à cela, nous avons effectué des essais en éliminant à chaque fois l'un des paramètres suivants : NaOH, CaCl_2 et le Tween 80. Pour chaque niveau, le même essai est réalisé deux fois.



Figure 21: Matière emprisonnée dans la phase huileuse

3.3 Etape 03

Après avoir remédié au problème rencontré durant l'étape 02, nous sommes passés à l'étape 03 où nous avons effectué les essais de 9 à 16 comme énumérés et décrits dans le tableau 13.

Tableau 13 : Paramètres de formulation des essais 9 à 16 de l'étape 03.

N° de l'essai	Rapport de phase	Emulsification					Réticulation				
		Phase aqueuse		Phase huileuse		NaOH (ml)	Temps et vitesse d'émulsification	Acide acétique(g)	Temps et vitesse de réticulation	CaCl ₂ (mol/l)	Tween80 (g)
		CaCO ₃ (g)	Alginate de sodium(g)	Huile(g)	Span80 (g)		400 tr/min pdt 15min	2.249	400 tr/min pendant 10min		
9	30/70	5	1	70	1	Sans				0,05	1
10	50/50	7	2	50	1	Sans	1000 tr/min pdt 15min	7.145	1000tr/min pdt 10min	0,05	1
11	30/70	5	1	70	1	10ml 5%	400 tr/min pdt 15min	2.249	400 tr/min pendant 10min	Sans	sans
12	50/50	7	2	50	1	10ml 5%	1000 tr/min pdt 15min	7.145	1000tr/min pdt 10min	Sans	Sans

13	30/70	5	1	70	1	10ml 5%	400 tr/min pdt 15min	2.249	400 tr/min pendant 10min	0,05	Sans
14	50/50	7	2	50	1	10ml 5%	1000 tr/min pdt 15min	7.145	1000tr/min pdt 10min	0,05	Sans
15	30/70	5	1	70	1	10ml 5%	400 tr/min pdt 15min	2.249	400 tr/min pendant 10min	0,05	Sans
16	50/50	7	2	50	1	10ml 5%	1000 tr/min pdt 15min	7.145	1000tr/min pdt 10min	0,05	Sans

Essais 9 et 10

Dans cet essai la solution de NaOH à 5% a été éliminée du processus. La matière (microparticules d'alginate) était toujours emprisonnée dans la phase huileuse, comme illustré dans la figure 21, cela nous permet de conclure que le NaOH n'était pas responsable de ce problème.

Essais 11 et 12

En éliminant la solution de CaCl₂ contenant 1% de Tween, nous avons pu aboutir à une réticulation. A ce stade, nous avons jugé que l'emprisonnement de la matière dans la phase huileuse est lié à l'un de ses composants.

Pour remédier à ce problème nous avons procédé à l'élimination du Tween dans l'essai suivant.

Essai 13 et 14

L'élimination du Tween 80 de la solution de CaCl₂ à 0,05M, a résolu le problème de la matière emprisonnée comme illustré dans la figure 22, ce qui nous amène à exclure le Tween 80 du protocole.

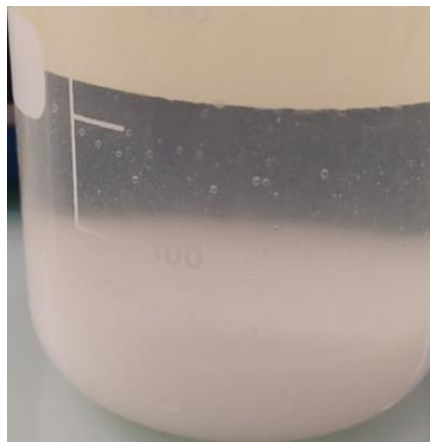


Figure 22 : Matière bien réticulée et non emprisonnée.

Essais 15 et 16

Les essais 15 et 16 similaires aux 13 et 14 attestent que le Tween 80 est responsable du phénomène décrit dans la figure 21. La réticulation étant satisfaisante comme le montre la figure 23, nous continuons notre protocole par une série de lavages, afin d'éliminer l'excès d'huile résiduelle. Nous réalisons trois lavages successifs avec un tampon acétate de sodium/acide acétique pH=4,5 en enlevant à chaque fois l'excès d'huile.

La quantité de tampon rajouté est de 71,4 ml. La matière obtenue est divisée en 2 parties, la première est laissée à l'air libre durant 24 h tandis que la deuxième est mise à l'étuve 40°C puis pesée chaque heure jusqu'à stabilisation de la masse. Nous avons constaté que le séchage à l'étuve était plus rapide que le séchage à l'air libre, cependant, le résultat obtenu des deux méthodes de séchage n'était pas convainquant.

Par ailleurs, le taux d'humidité résiduelle contribue au choix de la méthode de séchage. En effet le taux obtenu au séchage à l'air libre était plus grand par rapport à celui obtenu au séchage à l'étuve, comme indiqué dans le tableau 14. Dans deux cas, les matières obtenues étaient rigides et non individualisées (figures 24 et 25) d'où la décision de procéder au séchage par lyophilisation (étape 4).

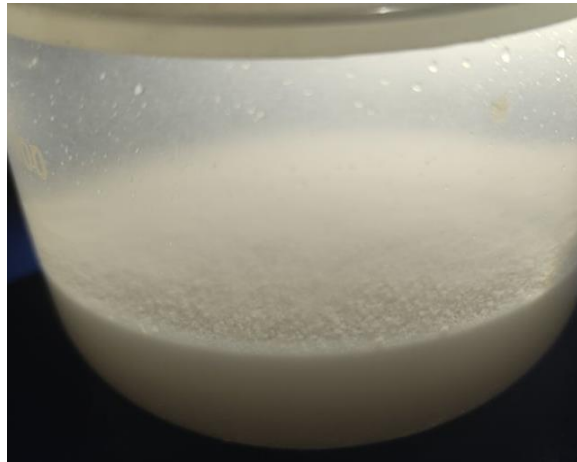


Figure 23 : matière réticulée



Figure 24 : matière séchée a l'air libre



Figure 25 : matière séchée a l'étuve

Tableau 14 : Taux d'humidité des essais 15 et 16.

Essais \ HR%	A l'air libre	A l'étuve
15	4.75	1
16	12.5	10

3.4 Etape 04

Dans cette étape, l'étape de séchage fait appel à la lyophilisation. Les paramètres des formulations sont énumérés dans le tableau 15.

A la fin des lavages (figure 26), la matière obtenue est congelée pour qu'elle soit ensuite lyophilisée. La lyophilisation est un procédé efficace car il permet de sécher la matière par sublimation, ce qui réduit considérablement la teneur résiduelle en eau.

La matière obtenue avec ce procédé est sous forme d'une poudre sèche dont les particules sont parfaitement individualisées, comme le montre la figure 27. Pour apprécier l'efficacité de cette méthode de séchage, nous avons également procédé à une dessiccation et nous avons eu les résultats montrés dans le tableau 16.

Tableau 15 : Paramètres de formulation des essais 17 et 18 de l'étape 04.

N° de l'essai	Rapport de phase	Emulsification						Réticulation		
		Phase aqueuse		Phase huileuse		NaOH (ml)	Temps et vitesse d'émulsification	Acide acétique (g)	Temps et vitesse de réticulation	CaCl2 (mol/l)
		CaCO3 (g)	Alginate de sodium(g)	Huile (g)	Span 80 (g)					
17	30/70	5	1	70	1	10ml 5%	400 tr/min pdt 15min	2.249	400 tr/min pendant 10min	0,05
18	50/50	7	2	50	1	10ml 5%	1000 tr/min pdt 15min	7.145	1000tr/min pdt 10min	0,05



Figure 26 : Matière réticulée après lavage

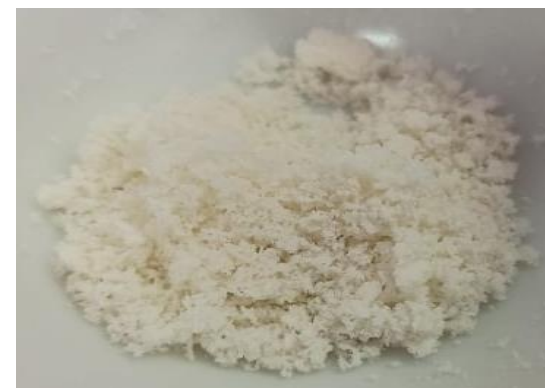


Figure 27 : Poudre sèche parfaitement individualisée

Tableau 16: Taux d'humidité des essais 17 et 18.

Essais	HR %
17	2.3
18	8

A l'issue des essais préliminaires, nous concluons que nous avons pu obtenir avec succès des microparticules parfaitement individualisées et sèches, formant une poudre homogène comme le montre la figure 27. Vu son efficacité, la lyophilisation a été adoptée comme mode de séchage dans notre protocole. En effet, durant ces essais, nous avons constaté que le taux d'humidité résiduelle augmentait pour les formulations dont le rapport de phase était de 50/50% par rapport aux formulations de 30/70%. Dans cette étape, nous avons pu réduire le taux d'humidité résiduelle. En effet, le séchage à l'air libre et à l'étuve a donné des taux plus élevés que celui de la lyophilisation.

Pour mieux apprécier les résultats obtenus, nous complétons la caractérisation par :

➤ Aspect granulométrique

L'analyse des microparticules est réalisée en utilisant un microscope optique type OPTIKA doté d'une caméra (4083-B5, DIGITAL CAMERA), reliée à un ordinateur (figure 28). La caméra permet une capture directe des images, ces dernières sont traitées à l'aide du logiciel vision lite 2.1. L'observation se fait au grossissement 2592x1944.

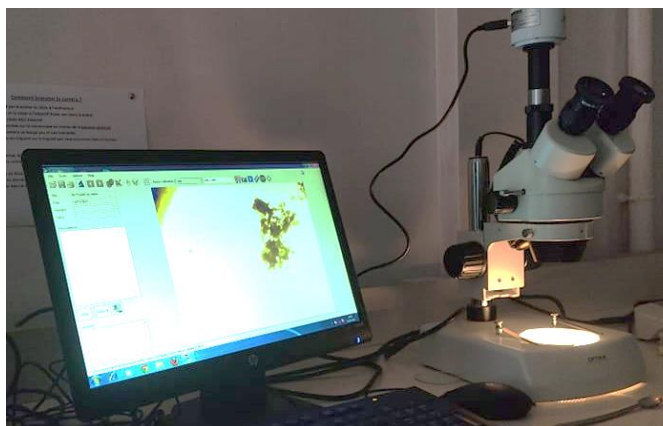


Figure 28: Microscope OPTIKA relié à un ordinateur.

Après obtention des microparticules d'alginate et une fois séchées. Ces dernières sont soumises à une étude granulométrique à l'aide du microscope optique à caméra. Les résultats obtenus varient selon les paramètres de formulation utilisés. Les résultats obtenus de l'analyse des essais 17 et 18 montrent des grains de particules de taille micrométrique (figure 29). Cependant, l'essai 18 montrait des résidus d'huile (formulation 30/70) comme le montre la figure 30.

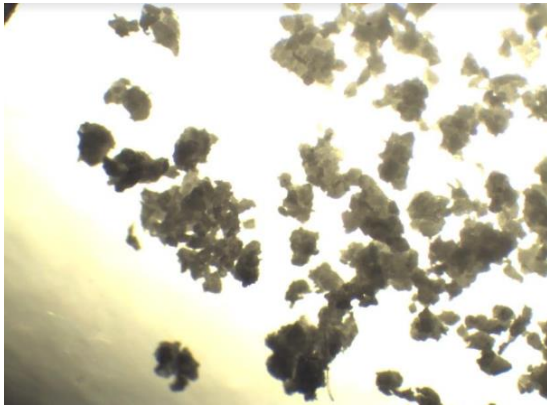


Figure 29 : Aspect granulométrique de la formulation 17.

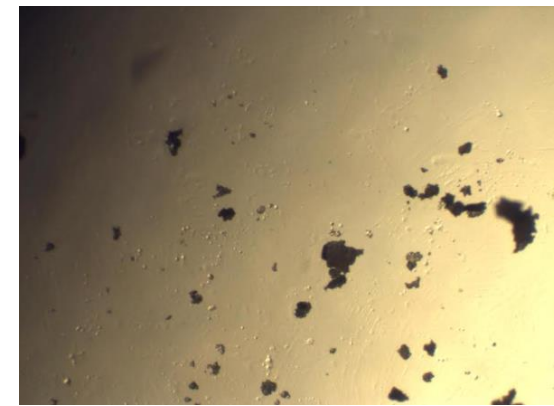


Figure 30 : Aspect granulométrique de la formulation 18.

3.5 Discussion générale

Dans notre travail, nous avons réalisé une encapsulation par gélification interne à base d'un système matriciel utilisant l'alginate de sodium comme biopolymère qui vise à encapsuler un principe actif médicamenteux.

L'objectif est d'aboutir à une matière de taille micrométrique, avec une libération prolongée dans le temps.

Pour ce faire, les essais préliminaires ont été conduits dans des conditions variables en rapport de phase de 30/70% et 50/50% (p/p), concentration en alginate de sodium de 2% et 3%, concentration en agent réticulant (CaCO_3) de 5% à 7% et en vitesse d'agitation de 400tr/min à 1000tr/min, ceci afin de définir une zone expérimentale de préparation optimale pour établir l'essai proprement dit.

4 Essai proprement dit

Après avoir délimité les intervalles d'expérimentation durant les essais d'orientation et fixer les variables les plus importants, nous nous intéressons dans cette partie à encapsuler le fénofibrate par la méthode de gélification interne pour ensuite caractériser les microparticules obtenues.

En variant la concentration de l'alginate (**C1**), la concentration du CaCO_3 (**C2**) ainsi que la vitesse de rotation (**V**), nous avons fixé des intervalles pour chaque paramètre. Pour chaque variable nous avons choisi 3 niveaux de valeurs, une minimale (**-1**), une moyenne (**0**) et une maximale (**+1**), comme indiqué dans le tableau 17.

Cette démarche a pour intérêt de sélectionner la formule qui présente les meilleures caractéristiques en termes d'encapsulation du fénofibrate et de cinétique de libération.

Tableau 17 : Intervalles des valeurs retenues pour l'essai proprement dit.

Paramètres	Zone optimale expérimentale	Valeur minimale (-1)	Valeur moyenne (0)	Valeur maximale (+1)
C1 (%)	[2-3]	2%	2.5%	3%
C2 (%)	[5-7]	5%	6%	7%
Vitesse agitation (tr/min)	[400-1000]	400	700	1000

Nous avons lancé 11 essais en variant à chaque fois les valeurs des 3 paramètres C1, C2 et V [39, 76]. Ces formulations sont citées dans le tableau 18 ci-dessous :

Tableau 18 : Matrice des essais d'optimisation.

Essais	C1	C2	Vitesse agitation (v)	Fénofibrate (mg)	C1(g)	C2(g)	V(tr/min)
1	0	0	0	20	0,75	1,8	700
2	0	0	0	20	0,75	1,8	700
3	1	-1	1	20	0,9	1,5	1000
4	1	1	-1	20	0,9	2,1	400
5	0	0	0	20	0,75	1,8	700
6	-1	1	1	20	0,6	2,1	1000
7	1	1	1	20	0,9	2,1	1000
8	1	-1	-1	20	0,9	1,5	400
9	-1	1	-1	20	0,6	2,1	400
10	-1	-1	1	20	0,6	1,5	1000
11	-1	-1	-1	20	0,6	1,5	400

5 Optimisation de la formule pour l'encapsulation du fénofibrate

5.1 Paramètres influençant la libération de PA

5.1.1 Concentration en alginate de sodium (C1) et en carbonate de calcium (C2)

La concentration en alginate de sodium et en carbonate de calcium sont les facteurs les plus importants qui impactent et modifient les caractéristiques des microsphères d'alginate. Comme il est démontré dans la partie théorique, la taille des microparticules augmente en augmentant les concentrations de C1 et C2. En effet cette taille influence directement le profil de libération de principe actif (page 44).

5.1.2 Vitesse d'agitation :

La vitesse d'agitation est utilisée pour contrôler la taille des particules, son augmentation permet d'avoir des microparticules d'alginate plus fines.

5.2 Critères d'acceptation

5.2.1 Taux de dissolution

Le taux de dissolution est défini comme étant la quantité de principe actif libérée dans les milieux physiologiques à savoir le milieu gastrique et intestinale.

5.2.2 Taux d'encapsulation

Le taux d'encapsulation est défini comme étant la quantité de principe actif emprisonné dans les microparticules d'alginate.

5.3 Matières et méthode

5.3.1 Matière première

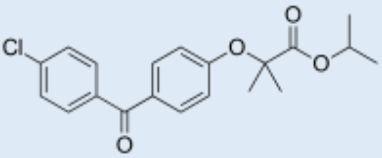
Le fénofibrate est un médicament, de la classe des fibrates, indiqué dans le traitement de l'hypercholestérolémie primaire, des dyslipidémies mixtes et de l'hypertriglycéridémie sévère chez les personnes ayant un risque de maladie cardiaque et n'ayant pas réussi à les faire baisser par un régime [121].

Propriétés physico-chimiques

- Poudre cristalline blanc cassée
- Pratiquement insoluble dans l'eau
- Peu soluble dans le chlorure de méthylène
- Soluble dans l'éthanol, l'acétone et l'éther. [122]

Les autres propriétés de cette matière active sont décrites dans le tableau 19 :

Tableau 19 : Propriétés du fénofibrate.

Structure chimique	
Formule	$C_{20}H_{21}ClO_4$ [Isomères]
N° CAS	49562-28-9
Demi-vie d'élimination	20 heures
Point de fusion	79 à 82°C

5.3.2 Méthodes

➤ Encapsulation du fénofibrate dans les microparticules d'alginate

On prépare des microsphères d'alginate par émulsification/gélification interne avec un rapport de phases de 30/70 (% p/p). Le principe est le même que celui des essais d'orientations, sauf que le fénofibrate est contenu dans la phase aqueuse pour qu'il puisse être intégré dans les microparticules après réticulation.

➤ Introduction de fénofibrate :

En raison de ces propriétés physicochimiques, le fénofibrate est insoluble dans l'eau. Le fénofibrate doit être introduit dans la phase aqueuse. Pour cela nous avons procédé à une dispersion du principe actif dans la phase aqueuse, sous agitation magnétique de 300 trs/min à une température ne dépassant pas 79 °C.

➤ Protocole d'encapsulation

1. Préparer la phase aqueuse à 30 % :

- Peser 20mg de fénofibrate ;
- Faire disperser la quantité de fénofibrate dans 30 ml d'eau distillée ;
- Peser la quantité d'alginate de sodium (p/p) ;
- Faire dissoudre la quantité d'alginate de sodium dans la dispersion médicamenteuse ;
- Laisser la solution obtenue sous forte agitation à 70°C jusqu'à dispersion totale du polymère ;

2. Ajouter la quantité de CaCO_3 requise à la solution aqueuse d'alginate :

- Peser la quantité de CaCO_3 en respectant le rapport massique (p/p) $\text{Ca}/\text{alginate}=7.3$;
- Continuer l'homogénéisation de notre solution en maintenant l'agitation sous une température de 70°C ;

3. Préparer la phase huileuse à 70% :

- Peser la quantité voulu d'huile de tournesol ;
- Ajouter à l'huile une quantité de 1% de l'agent tensioactif ;
- Ajouter NaOH 5% à notre solution.

4. Lancer l'émulsification :

- Mettre la phase huileuse sous agitateur à hélice ;
- Ajout de notre solution aqueuse d'alginate de sodium à la phase huileuse d'une façon progressive tout en maintenant la même cadence ;

5. Procéder à la réticulation :

- Peser une quantité d'huile de tournesol ;
- Ajouter à cette huile une quantité d'acide acétique prélevée en respectant le rapport molaire acide/Ca=3.5 ;
- Ajouter le mélange obtenu à notre émulsion en maintenant l'agitation pendant un temps afin de permettre la solubilisation du CaCO_3 .

6. Ajouter le CaCl_2 à 0.05 M et laisser agiter à 400 trs/min afin de débarrasser les billes formées de toute huile résiduelle.

7. Lavage des particules d'alginate formées :

- Préparer une solution tampon acétate à pH 4.5 ;
- Introduire le tampon à notre solution contenant les microparticules et laisser agiter à 200 trs/min ;
- Enlever la phase huileuse qui apparaît en haut de la solution ;
- Répéter la procédure au moins trois fois jusqu'à ce qu'on juge qu'il n'y ait plus d'huile résiduelle ;

8. Récupérer les microparticules d'alginate :

- La matière est alors récupérée sous forme de culot après centrifugation ;
- Le culot a été filtré à l'aide d'une pompe sous vide ;
- Conserver les microsphères à une température de congélation jusqu'à séchage ;

9. Lyophilisation

Tout le procédé est résumé dans le schéma suivant (figure 31).

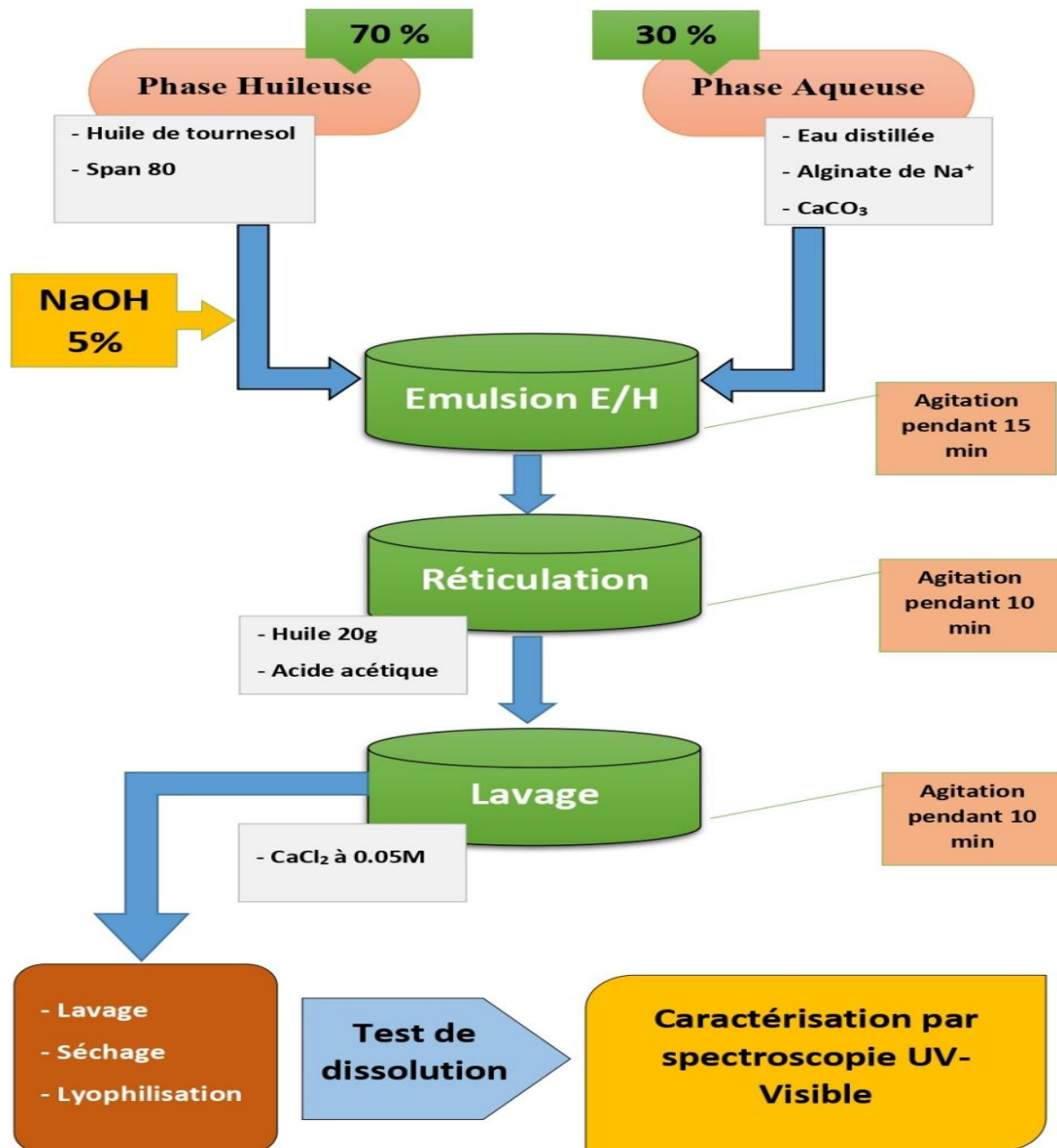


Figure 31 : Schéma représentatif du procédé de formulation des microparticules d'alginate.

5.4 Caractéristiques physico chimiques

5.4.1 Evaluation des performances in vitro des microparticules d'alginate

Une fois le principe actif encapsulé par méthode de gélification interne, nous étudions l'aptitude de ces particules à pouvoir libérer le principe actif. Pour cela, nous procédons au test de dissolution qui nous permet de suivre à des intervalles de temps réguliers la libération de la matière active depuis les particules d'alginate.

L'essai de dissolution est un test pharmaco-technique destiné à déterminer la plus ou moins aptitude des formes galéniques à laisser passer dans un milieu déterminé le principe actif quelle contient. Le passage en solution est apprécié par la présence du PA dans les échantillons prélevés du milieu de dissolution grâce aux dosages par spectroscopie UV-Visible.

Les essais de dissolution des microparticules polymériques encapsulant le fénofibrate ont été réalisés à l'aide de l'appareil SOTAX à palettes tournantes (figure 32). Les échantillons de microcapsules sont soumis à une agitation constante dans des cuves contenant 500 ml de milieu de dissolution acides puis basique, préparés au préalable et mis à une température de $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. La vitesse de rotation des palettes est fixée à 100 trs/min.

Dans chaque milieu, aux temps déterminés 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, des échantillons de 5 ml du milieu ont été prélevés manuellement à l'aide d'une pipette et une quantité équivalente du milieu de dissolution est ajoutée de nouveau pour maintenir le volume du milieu constant. Les échantillons sont ensuite passés à la filtration par un filtre seringue.

Le filtrat obtenu est dilué avec de l'éthanol 99.6° (v/v) puis dosés par spectrophotométrie UV-Visible (figure 33) à 286 et 290 nm pour les milieux acide et basique respectivement, contre un blanc échantillon et un étalon.



Figure 32 : Dissolutest à palettes tournantes.



Figure 33 : Spectroscopie UV-Visible.

➤ Courbe étalonnage

Une courbe d'étalonnage a été utilisée afin de déduire les concentrations du fénofibrate libérées durant les études de dissolution à des temps préétablis. Une longueur d'onde de 286 nm et de 290 nm (qui correspond à un maximum d'absorption) ont été retenue après balayage spectrale entre 200 et 400 nm de la molécule dissoute dans un mélange du milieu de dissolution et l'éthanol (v/v).

6 Résultats et discussion

La libération in vitro du fénofibrate à partir de microparticules d'alginate chargées a été évaluée en mesurant le pourcentage de libération cumulée. Les résultats ont montré qu'à pH 1,2 (SGF), presque toutes les microparticules étaient conservées intactes avec de très faibles quantités libérées de PA. Ce comportement dépend de la nature du polymère. En effet, en milieu acide l'alginate de sodium ne se solubilise pas. Le passage du fénofibrate dans le milieu est uniquement gouverné par un phénomène de diffusion à travers le système matriciel polymérique. Ces conclusions s'accordent à celles retrouvées dans la littérature. En effet, dans leur étude, S. Shukla et al. ont procédé à l'encapsulation du furoate de diloxanide dans des microsphères d'alginate par un procédé d'émulsification/gélification interne. Lors de l'étude de libération du médicament in vitro de toutes les microsphères dans un milieu gastro-intestinal (GI) simulé à des pH différents, le pourcentage cumulé du taux de médicament libéré à partir des microsphères dans SGF et SIF après 4h variait $5,62 \pm 0,66\%$ à $14,41 \pm 1,35\%$ [62].

Pour le milieu à pH= 7,4 et après 4h d'essai, la libération du médicament variait de $17,87 \pm 0,51\%$ à $28,00 \pm 0,97\%$. L'étude a également démontré que les billes d'alginates maintiennent leur intégrité dans l'estomac et l'intestin grêle [62].

De leur part, M.M. Ahmed et al [76] ont préparé des microparticules de diclofénac sodique-alginate de sodium par émulsification/gélification interne, Les microparticules d'alginate chargées ont été évaluée en mesurant le pourcentage de libération cumulé. Les résultats ont montré qu'à pH 1,2 toutes les microparticules étaient conservées intactes presque sans gonflement, ce qui a ralenti la vitesse de libération du médicament (pas plus de 16% du médicament chargé a été libéré) qui est également peu soluble dans ce milieu [76]. Au contraire, lors du passage des microparticules du milieu SGF vers le milieu SIF, une amélioration prononcée a été détectée quant à la fraction dissoute du médicament en raison du gonflement des microparticules et de l'augmentation de la vitesse de libération [76].

En effet, les résultats des 11 formulations ont montré que la libération in vitro du médicament à partir des microparticules est pH dépendante. Dans la région acide, nous observons pour les 11 formulations de faibles taux de dissolution sauf pour la formulation F5 qui présentait un taux de dissolution maximum de 31,25% mais qui reste inférieur à 50%. Ces faibles taux de dissolution en milieu acide sont dus essentiellement à la faible solubilité de l'alginate de sodium en milieu acide, ce qui permet à l'alginate de rester sous forme réticulé d'où son intérêt dans la production de formes galéniques gastro-résistantes. Mais aussi à la structure interne qui pourrait laisser échapper le PA tout en conservant intacte le réseau polymérique.

Par la suite, lors du passage des microparticules du milieu acide vers la région alcaline, une amélioration prononcée a été détectée dans le taux de libération du médicament, en raison de l'augmentation de la solubilité du biopolymère. En effet, seules les formules 4 (tableau 21), 6 (tableau 20) et 9 (tableau 21) ont montré un taux de dissolution remarquable indiquant alors une efficacité d'encapsulation optimale, puisque nous retrouvons dans le milieu un taux de dissolution correspondant à la dose théorique $\pm 10\%$.

Les valeurs maximale et minimale du taux de dissolution de 109,73% et 43,43% ont été observés pour les formules F6 et, F3 respectivement. Après 4 heures d'essai.

Par ailleurs, toutes les formules montrent une libération prolongée. En effet, l'allure des courbes présentées dans la figure 34 à 40 est presque similaire. Toutes les formulations libèrent de manière progressive leur contenu médicamenteux à une plus grande vitesse dans le milieu basique.

Cependant, pour expliquer ces résultats et comprendre les phénomènes incriminés dans ce processus biopharmaceutique (libération et dissolution), nous avons fait une étude paramétrique et comparative entre les 11 formules. Différents profils de dissolution sont obtenus et cela est dû principalement aux variables de formulation, à savoir la concentration en alginate de sodium (C1), concentration en CaCO_3 (C2), mais aussi à la vitesse d'agitation (V).

Dans ce qui suit, nous allons décortiquer et analyser l'influence de chaque paramètre sur le taux de dissolution de ces formulations et leur efficacité d'encapsulation respectives.

➤ Influence de la concentration en alginate de sodium sur le taux de dissolution des microparticules d'alginate

Nous savons d'après la littérature que la concentration en alginate de sodium (C1) a un rôle crucial dans les propriétés des microparticules formées. Pour ce faire, nous allons prendre les

formulations dont le paramètre variable est la concentration en alginate de sodium en maintenant fixe le C2 et le V.

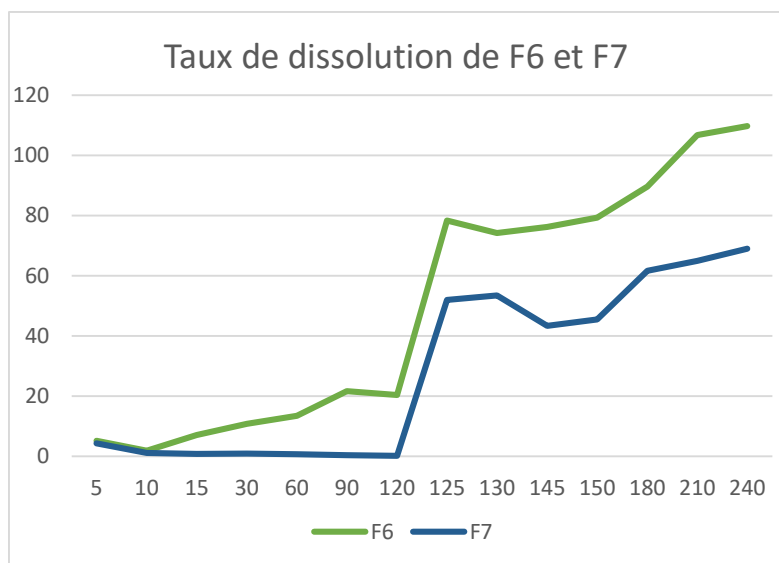


Figure 34 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F6 et F7.

Tableau 20 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F6 et F7.

Formulation	C1	C2	V	% à 2h	% à 4h
6	-1	1	1	20,45	109,73
7	1	1	1	0,23	69,05

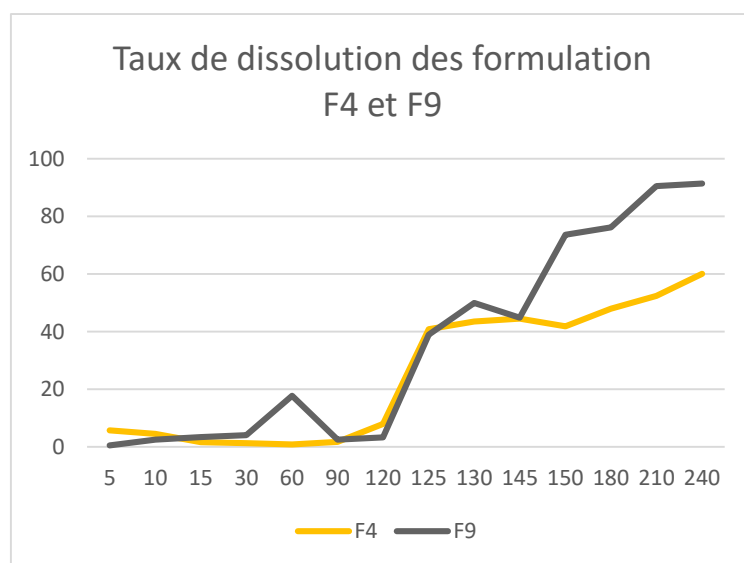


Figure 35 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F4 et F9.

Tableau 21 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F4 et F9.

Formulation	C1	C2	V	% à 2h	% à 4h
9	-1	1	-1	3,27	91,39
4	1	1	-1	7,98	60,007

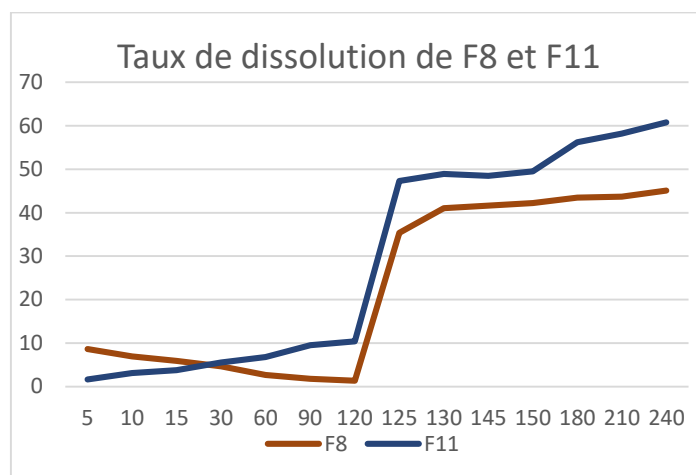


Figure 36 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F8 et F11.

Tableau 22 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F8 et F11.

Formulation	C1	C2	V	% à 2h	% à 4h
11	-1	-1	-1	10,42	60,78
8	1	-1	-1	1,29	45,07

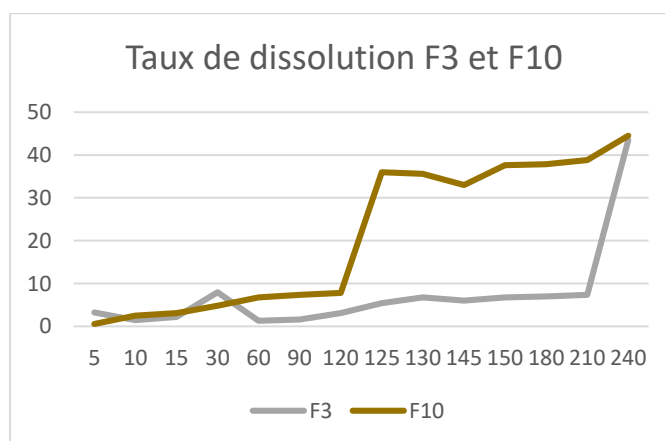


Figure 37 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F3 et F10.

Tableau 23 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F3 et F10.

Formulation	C1	C2	V	% à 2h	% à 4h
10	-1	-1	1	7,83	44,48
3	1	-1	1	3,12	43,43

Nous avons choisi 4 combinaisons binaires {10 ; 3}, {9 ; 4}, {11 ; 8}, {6 ; 7}, pour pouvoir interpréter nos résultats.

Comme nous le constatons dans les graphes et tableaux correspondants, les taux de dissolution diminuent lorsque la concentration en alginate de sodium augmente, par exemple les formulations 6 et 7 présentent des taux de dissolution de 20,45% contre 0,23% en milieux acide et de 109,73% contre 69,05% en milieux basique, respectivement. Pour les formulations 9 et 4, leurs taux de dissolution respectifs sont 91,39% et 60,007% après 4 heures d'essai, nous avons également fait la comparaison entre les formules 10 et 3 ainsi que 11 et 8.

Ce constat revient probablement à une plus importante réticulation, en présence de concentrations élevées d'alginate de sodium, ce qui induit la formation de microparticules plus rigides qui se solubilisent plus lentement par rapport aux microparticules produites avec des concentrations moins élevées en alginate de sodium. Cette constatation a également été rapporté par Shukla, Yotsuyanagi et Basu dans leurs études respectives [62, 112, 123].

Il a été également constaté que la taille moyenne des billes ainsi que l'efficacité de l'encapsulation augmentent avec l'augmentation de la concentration d'alginate [60-63].

Concernant la forme obtenue, Rajinikanth, Sankar et Mishra [65] ont rapporté qu'une concentration d'alginate à 6% donnait de petites microsphères d'alginate alors qu'à 2% c'était des agrégats de petites microsphères qui se formaient. L'efficacité d'encapsulation augmentait également de 77,3% à 91,8% avec l'augmentation de la concentration en alginate de 2% à 6% (p/v) respectivement. En revanche, dans leur étude Silva et al [64] ont rapporté que l'efficacité de l'encapsulation diminuait lorsque de la concentration en alginate augmentait de 2% à 3% (p/v).

Cette interprétation doit être combinée avec l'analyse de l'influence de la concentration en agent réticulant. Car, un taux élevé en Ca^{2+} pourrait contribuer à réduire le taux de dissolution en augmentant le taux de réticulation. Ce phénomène peut également être du à l'exérèse qui pourrait se produire lors de la phase de réticulation et qui reflète une déperdition de la dose

médicamenteuse, ce qui peut expliquer une faible efficacité d'encapsulation. Ce phénomène est très rencontré lors de la gélification interne [64]

➤ Influence de la concentration en CaCO_3 sur le taux de dissolution des microparticules d'alginate

La même démarche a été reconduite afin d'étudier l'influence de l'agent réticulant C2 en l'occurrence le CaCO_3 .

Lorsque les ions Ca^{2+} sont introduits dans une solution de polymère d'alginate, les ions Ca^{2+} se situent entre des molécules d'alginate électronégatives et forment une structure réticulée connue sous le nom de modèle de « Boîte à œufs ». Il est alors plus facile de contrôler le profil de libération des agents actifs dans un système à libération prolongée pour divers médicaments, protéines et cellules en adaptant la concentration de réticulation[40, 124]

En respectant le même raisonnement pour étudier l'influence de C2 sur la libération du PA, nous avons observé des cinétiques de dissolution différentes entre les formulations suivantes : {3 ; 7}, {8 ; 4}, {10 ; 6}, {11 ; 9}.

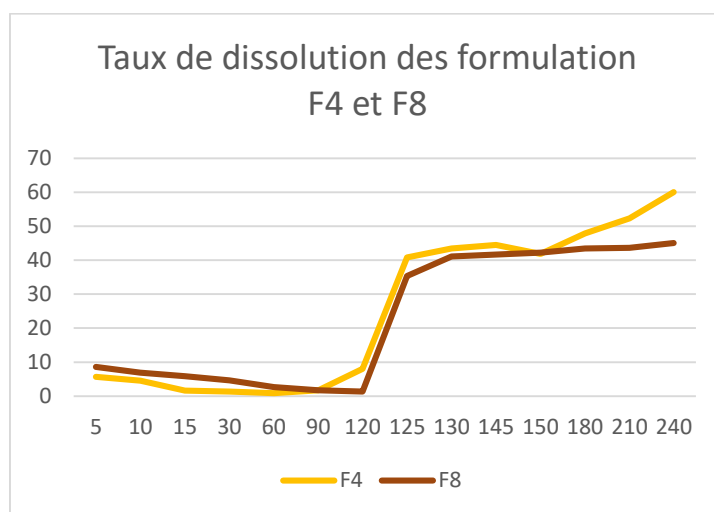


Figure 38 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F4 et F8.

Tableau 24 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F4 et F8.

Formulation	C1	C2	V	% à 2h	% à 4h
8	1	-1	-1	1,29	45,07
4	1	1	-1	3,27	91,39

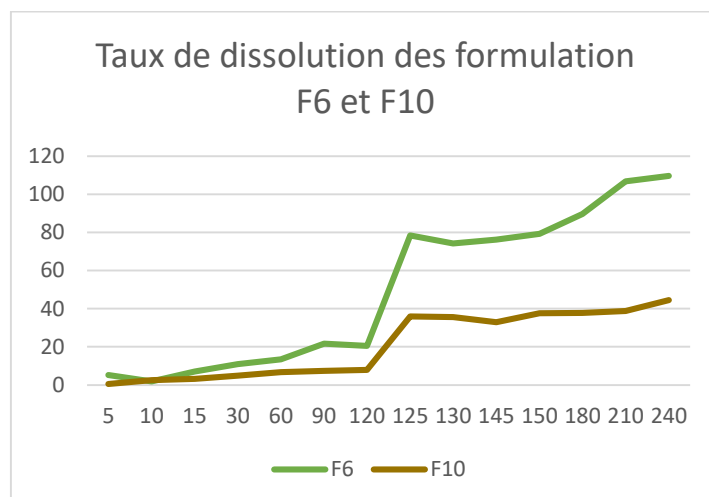


Figure 39 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F6 et F10.

Tableau 25 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F6 et F10.

Formulation	C1	C2	V	% à 2h	% à 4h
10	-1	-1	1	7,83	44,48
6	-1	1	1	20,45	109,73

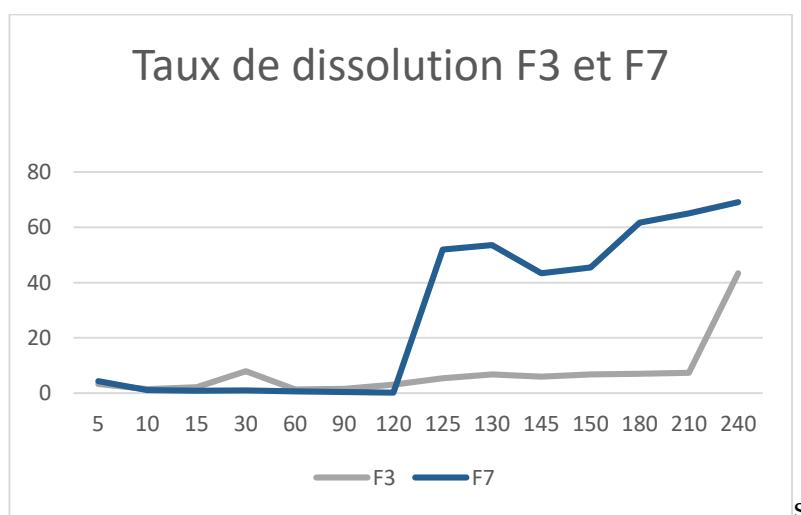
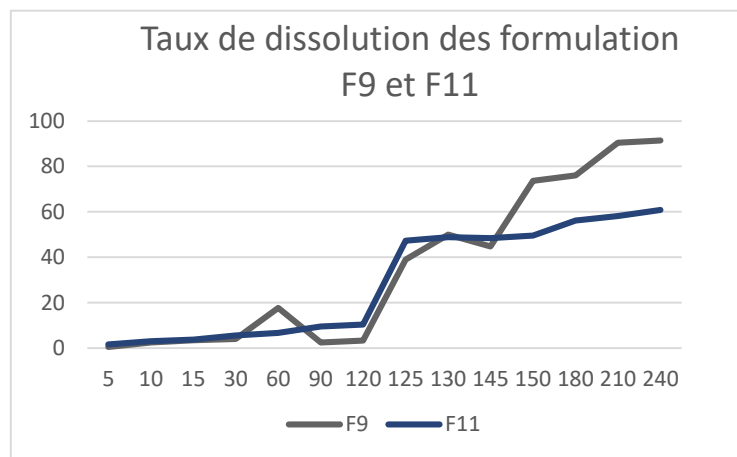


Figure 40 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F3 et F7.

Tableau 26 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F3 et F7.

Formulation	C1	C2	V	% à 2h	% à 4h
3	1	-1	1	3,12	43,43
7	1	1	1	0,23	69,05


Figure 41 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F9 et F11.
Tableau 27 : Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F9 et F11.

Formulation	C1	C2	V	% à 2h	% à 4h
11	-1	-1	-1	10,42	60,78
9	-1	1	-1	3,27	91,39

Nous remarquons que le taux de dissolution en milieu basique augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration en agent réticulant C2. En effet, les formulations 9 et 11 présentent des taux de dissolution de 10,42 et 3,27 en milieu acide, ainsi que des taux de 91,39% et 60,78% après 4h d'essai, respectivement. La différence des résultats obtenus entre les deux formules est aussi due à la concentration en alginate de sodium. En effet, la formule 11 présenterait une faible efficacité d'encapsulation qui serait due au faible taux de réticulation. Aussi, la porosité de la structure pourrait contribuer à laisser passer précocement le PA en milieu acide avec un taux de 10,42% contre 3,27% pour la formule 9.

En ce qui concerne les formulations 3 et 7 les taux de dissolution observés étaient de 43,43% et 63,05% respectivement, après 4h de dissolution. La même tendance est exposée par les formules 8 et 4 (tableau 24) ainsi que 10 et 6 (tableau 25).

Comme le montrent les deux formulations 6 et 11 qui présentaient des taux de dissolution de 20,45% et 10,42% en milieux acide et de 109,73% et 60,78% en milieux basique respectivement, nous concluons que le taux de dissolution augmentait avec l'augmentation de la concentration en carbonate de calcium.

Nous pouvons rajouter également qu'à meilleur taux d'encapsulation est observé pour des formules aux C2 élevées.

Tableau 28: Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F6 et F11.

Formulation	C1	C2	V	% à 2h	% à 4h
6	-1	1	1	20,45	109,73
11	-1	-1	-1	10,42	60,78

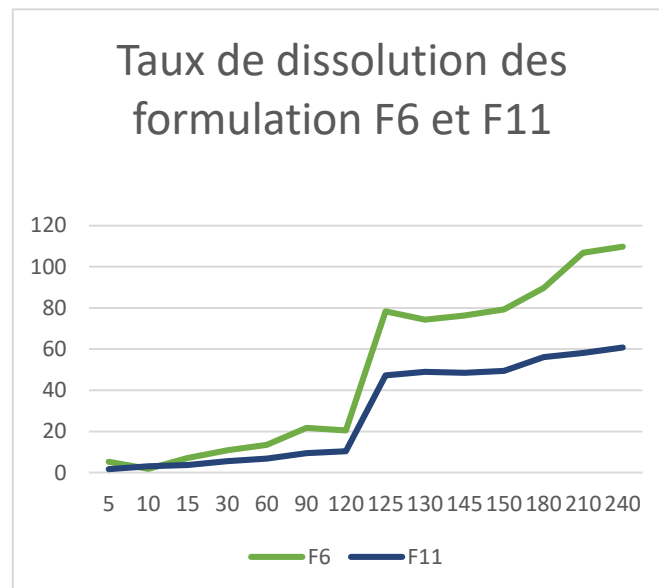


Figure 42: Comparaison des pourcentages de dissolution des formulations F6 et F11.

Concernant l'aspect des microparticules obtenues, Baimark, et Srisuwan [125] ont rapporté qu'une faible concentration de Ca^{2+} de 0,5% et 1,25% aboutissait à des microsphères d'alginate agglomérées. La concentration C2 est insuffisante pour le durcissement des microsphères. Tandis que l'efficacité d'encapsulation augmentait de 77% à 82% lors du passage de 2,5% à 10% d'alginate respectivement. Ce phénomène peut être expliqué par l'augmentation du Ca^{2+} qui induit un durcissement plus rapide des microsphères d'alginate et gêne la sortie du médicament hors des gouttelettes d'alginate durant le processus de réticulation [125].

➤ Influence de la vitesse d'agitation sur le taux de dissolution des microparticules d'alginate

Concernant la vitesse d'agitation nous constatons qu'elle n'impacte pas de façon significative le taux de dissolution. Cependant, des études antérieures ont rapporté que la vitesse d'agitation modifiait la taille des microparticules formées. En effet, une vitesse plus grande produit des microparticules plus petites et cela s'explique par la grande force de cisaillement qui induit la formation de gouttes plus petites chose qui a été démontré par les études de Ahmed et al [76] ainsi que Shukla et al [62].

D'une autre part, Shukla et al [62] ont trouvé que l'EE diminue de 71,1% à 64,8% avec l'augmentation de la vitesse d'agitation de 100 à 1500tr/min , respectivement. Ce qui est dû à la diffusion du principe actif de la phase aqueuse vers la phase huileuse provoquée par l'augmentation de la vitesse d'agitation.

• Temps de réticulation

Durant notre étude le temps de réticulation a été fixé à 10 min que nous avons jugé comme temps optimal, cette valeur a été choisie après recueil de données dans de nombreuses thèses. Cependant, ce paramètre avait une certaine influence sur l'EE du médicament. Dans l'étude Z. Rahman et al [126], ont rapporté que l'EE diminuait de 84,31% à 46,52% en augmentant le temps de réticulation de 10min à 30min, respectivement. Ceci est expliqué par le déplacement du médicament par effet d'exérèse à cause des ions Ca^{2+} qui diffusent dans les microsphères réduisant ainsi l'EE du médicament [126].

D'une autre part, la réduction du temps de réticulation entraîne une gélification incomplète de la solution d'alginate de sodium causant ainsi la diminution de l'EE [40]. Inversement à la taille, l'EE diminue de 77,3% à 49,9% en augmentant le temps de réticulation de 5min à 25min. Ceci peut s'expliquer par le temps de réticulation prolongé, qui conduit à des microsphères de taille plus grande. Par ailleurs, l'augmentation ou la diminution de l'EE du médicament dépend du type de médicament encapsulé ainsi que du procédé de fabrication des microsphères d'alginate [65].

➤ Discussion générale des résultats

Les essais ont été conduits dans des conditions variables de concentrations en alginate de sodium allant de 2% à 3% et de chlorure de calcium allant de 5% à 7%, à des vitesses d'agitation différentes (400, 700 et 1000 trs/min). Concernant l'alginate de sodium, le passage de faibles

concentrations aux concentrations plus élevées permettrait d'avoir une meilleure rigidité et une individualisation des microparticules, avec un allongement du temps de dissolution.

Par contre, l'augmentation de la concentration en agent réticulant à savoir le CaCO_3 a permis d'augmenter le taux de dissolution. En effet, toutes les formulations avec C2 (7%) maximale engendrent un taux élevé de dissolution.

Enfin, en variant la vitesse d'agitation de 400 à 1000 trs/min nous n'avons pas trouvé un impact significatif sur les propriétés des microparticules. Toutes les microparticules étaient semblables tant sur le plan macroscopique qu'en termes de profils de dissolution.

L'interprétation des résultats obtenus confirme que les variables C1 et C2 ont une influence non négligeable sur le taux de dissolution des microparticules polymériques en milieu acide et basique. Par ailleurs, les formules qui présentent un meilleur taux d'encapsulation présentent tous un taux élevé en Ca^{2+} , au contraire celles qui présentent un faible taux d'encapsulation sont préparées avec les valeurs minimales en Ca^{2+} .

Nous l'avons compris, C1 et C2 sont les paramètres de formulation à prendre en considération si l'on veut obtenir une efficacité d'encapsulation optimale. La vitesse d'agitation n'a visiblement pas d'influence sur cette dernière.

Cependant, des essais complémentaires doivent être conduits avec une caractérisation plus approfondie notamment à l'échelle micrométrique

**Conclusion
générale et
perspectives**

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans notre travail, nous avons réalisé une encapsulation du fénofibrate par un procédé de gélification. Ceci afin d'aboutir à une forme galénique avec une libération prolongée dans le temps grâce à un système matriciel à base d'un biopolymère extrait d'algues brunes qui est l'alginate de sodium et un agent réticulant le CaCO_3 .

L'objectif principal de ce travail est de produire des microparticules d'alginate de taille micrométriques tout en évaluant l'influence des paramètres de formulation impliqués dans leur mise au point.

A travers cette étude nous avons constaté lors de la caractérisation des microparticules préparées, que la concentration d'alginate de sodium influe sur la libération du fénofibrate depuis les microparticules d'alginate, c'est-à-dire plus la concentration d'alginate augmente, plus on aura une libération prolongée dans le temps en d'autres termes une libération ralentie et pH-dépendante.

En ce qui concerne l'agent réticulant, les formules qui présentent un meilleur taux d'encapsulation contiennent toutes un taux élevé en Ca^{2+} . Tandis que la vitesse d'agitation est un paramètre qui impacte très peu le taux de libération du fénofibrate.

Les résultats de la dissolution in vitro des microparticules préparées montrent une libération prolongée jusqu'à quatre (04) heures pour toutes les formulations préparées, ce qui concorde avec le séjour du médicament dans l'intestin. La libération prolongée des microparticules permet de réduire les effets secondaires et de réduire la fréquence journalière de prise du médicament, ce qui est très pratique pour le patient.

Comme perspectives pour ce travail, il serait souhaitable de poursuivre les formulations afin de bien cerner l'impact de la vitesse d'agitation sur la taille des particules et le taux de dissolution et définir un meilleur rapport C1/C2. Cette étude combinée à d'autres méthodes de caractérisation telle que la microscopie, permet également de décrire les détails de la structure de ces microparticules polymériques.

Références

1. Perez, R., et al. *La culture des algues marines dans le monde*. 1992.
2. Pérez, R., *Ces algues qui nous entourent: Conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture*. 1997: Editions Quae.
3. Vincent, E., *The alginate and their applications in pharmacy and engineering. Application to the construction of a biomaterial*. 2010, UHP - Université Henri Poincaré. p. non renseigné.
4. Bary, P., *Les origines de la chimie colloïdale : A. Baudrimont (1806-1880)*. L'Expansion scientifique française (Paris).
5. Jouanneau, D., *Les phycocolloïdes*. 2010.
6. ERTESVÅG G H, H.H., SCHJERVEN H, SVANEM BIG and VALLA S, 'Mannuronan C5- epimerases and their application for in vitro and in vivo design of new alginates useful in biotechnology'. Metabolic Engineering, 1999
7. SMIDSRÉD O, H.A.a.B.L., 'Oxidative-reductive depolymerization: a note on the comparison of degradation rates of different polymers by viscosity measurements'. Carbohydr Res, 1967.
8. SMIDSRÉD O, H.A.a.L.B., 'Degradation of alginate in the presence of reducing compounds'. Acta Chem Scand, 1963.
9. SMIDSRÉD O, H.A.a.L.B., *The influence of pH on the rate of hydrolysis of acidic polysaccharides*, . Acta Chem Scand, 1966.
10. Travan, A., et al., *Non-cytotoxic silver nanoparticle-polysaccharide nanocomposites with antimicrobial activity*. Biomacromolecules, 2009. 10(6): p. 1429-1435.
11. Draget, K., *Alginates*. 2009. p. 807-828.
12. Pawar, S.N. and K.J. Edgar, *Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications*. Biomaterials, 2012. 33(11): p. 3279-3305.
13. BOUDERGA, *Adsorption du vert malachite par des composite « alginate/bentonite »*. 2005, Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid ; 2015.
14. Draget, K., et al. *Gel strength of Ca-limited alginate gels made in situ*. in *Fourteenth International Seaweed Symposium*. 1993. Springer.
15. Ben Messaoud, G., *Structuring and control of the architecture of alginate liquid-core capsules by biopolymers association*. 2015, Université de Lorraine.
16. Colwell, D.E., et al., *Monoclonal antibodies to Salmonella lipopolysaccharide: anti-O-polysaccharide antibodies protect C3H mice against challenge with virulent Salmonella typhimurium*. The Journal of Immunology, 1984. 133(2): p. 950-957.
17. Kuen YL, M.D., *Alginate: Properties and biomedical applications*. Progress in Polymer Science 2012.
18. Rinaudo, *Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials*. Centre de recherches sur les Macromolécules Végétales (CNRS). 2008, Joseph Fourier University.
19. Wee, S. and W.R. Gombotz, *Protein release from alginate matrices*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. 31(3): p. 267-285.

20. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Alginate: properties and biomedical applications*. Progress in polymer science, 2012. 37(1): p. 106-126.
21. Haug, A., *Composition and properties of alginates*. Norwegian Institute of Seaweed Research, 1964.
22. Dumont, *Élaboration et caractérisation de fibres mixtes Alginate/ Chitosane* 2017, Lyon : Université Claude Bernard Lyon 1
23. Cao, L., et al., *Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review*. Carbohydrate Polymers, 2020. 242: p. 116389.
24. Delphine, *Etude du transfert diffusionnel de solutés macromoléculaires dans les hydrogels d'alginate de calcium*. 2005, Lorraine : Institut National Polytechnique de Lorraine.
25. Simsek-Ege, F.A., G.M. Bond, and J. Stringer, *Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH*. Journal of Applied Polymer Science, 2003. 88(2): p. 346-351.
26. Skjåk-Braek, G., E. Murano, and S. Paoletti, *Alginate as immobilization material. II: Determination of polyphenol contaminants by fluorescence spectroscopy, and evaluation of methods for their removal*. Biotechnol Bioeng, 1989. 33(1): p. 90-4.
27. McHugh, D.J., et al., *Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera* 3. Precipitation, bleaching and conversion of calcium alginate to alginic acid*. Journal of Applied Phycology, 2001. 13(6): p. 471-479.
28. Wijesinghe, W.A. and Y.J. Jeon, *Enzyme-assisted extraction (EAE) of bioactive components: a useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: a review*. Fitoterapia, 2012. 83(1): p. 6-12.
29. Sharma, A. and M. Gupta, *Three phase partitioning of carbohydrate polymers: Separation and purification of alginates*. Carbohydrate Polymers, 2002. 48: p. 391-395.
30. Québec, O.d.p.d., *Les différentes formes pharmaceutiques*. 2019.
31. Liguori, *Les formes pharmaceutiques*. 2016.
32. *Les différentes formes de médicaments*, in Vidal de la famille. 2012.
33. Tønnesen, H.H. and J. Karlsen, *Alginate in Drug Delivery Systems*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2002. 28(6): p. 621-630.
34. Laurine CAULLET, A.D.S., Geoffrey KNIPPER, Margaux RUSALEN et Marie SEIGNEUR, *LES ÉMULSIONS ALIMENTAIRES ET COSMÉTIQUES*. 2017-2018. p. 50.
35. Liu X, M.Z., Xing J, Liu H, *Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2004.
36. Laurine CAULLET, A.D.S., Geoffrey KNIPPER, Margaux RUSALEN et Marie SEIGNEUR, *LES ÉMULSIONS ALIMENTAIRES ET COSMÉTIQUES*
37. Springinsfeld, F., *Gelification mechanism and rheological behaviour of partially crystallized alkane emulsions*. 2009, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI.
38. SMRDEL, P., M. BOGATAJ, and A. MRHAR, *The Influence of Selected Parameters on the Size and Shape of Alginate Beads Prepared by Ionotropic Gelation*. Scientia Pharmaceutica, 2008. 76(1): p. 77-90.

39. Silva, R., Isabel Vitoria Figueiredo, Alexandra Rocha Gonçalves, Francisco Veiga, *Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability*. International Journal of Pharmaceutics 2006.
40. Rastogi, R., et al., *Alginate microspheres of isoniazid for oral sustained drug delivery*. Int J Pharm, 2007. 334(1-2): p. 71-7.
41. Reis, C.P., et al., *Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles*. Journal of Microencapsulation, 2006. 23(3): p. 245-257.
42. McLachlan, J., *Macroalgae (seaweeds): industrial resources and their utilization*. Plant and Soil, 1985. 89(1): p. 137-157.
43. Poncelet, D., et al., *Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1992. 38(1): p. 39-45.
44. Redenbaugh, K., et al., *Somatic Seeds: Encapsulation of Asexual Plant Embryos*. Bio/Technology, 1986. 4(9): p. 797-801.
45. Lim, F. and A.M. Sun, *Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas*. Science, 1980. 210(4472): p. 908-10.
46. Shiotani, T. and T. Yamané, *A horizontal packed-bed bioreactor to reduce CO₂ gas holdup in the continuous production of ethanol by immobilized yeast cells*. European journal of applied microbiology and biotechnology, 1981. 13(2): p. 96-101.
47. Prevost, H., C. Divies, and E. Rousseau, *Continuous yoghurt production with Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus entrapped in Ca-alginate*. Biotechnology letters, 1985. 7(4): p. 247-252.
48. Lim, F., *Microcapsules containing viable tissue cells*. 1983, Google Patents.
49. Poncelet, D., et al., *Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. II. Physicochemistry*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995. 43(4): p. 644-650.
50. Poncelet, B., Dulieu, Picot, *A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1999. 155(2-3): p. 171-176.
51. Poncelet, *Production of alginate beads by emulsification/internal gelation*. Ann N Y Acad Sci, 2001. 944: p. 74-82.
52. Lencki, R.W., R.J. Neufeld, and T. Spinney, *Method of producing microspheres*. 1989, Google Patents.
53. Sarmento, B., et al., *Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation*. J Nanosci Nanotechnol, 2007. 7(8): p. 2833-41.
54. Pestovsky, Y. and A. Martinez-Antonio, *The Synthesis of Alginate Microparticles and Nanoparticles. Review*. 2019.
55. Liu, X.D., et al., *Characterization of structure and diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources*. J Microencapsul, 2002. 19(6): p. 775-82.
56. Nan, F., et al., *Uniform chitosan-coated alginate particles as emulsifiers for preparation of stable Pickering emulsions with stimulus dependence*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014. 456: p. 246-252.

57. Mohamed, A.I.A., et al., *Influence of Surfactant Structure on the Stability of Water-in-Oil Emulsions under High-Temperature High-Salinity Conditions*. Journal of Chemistry, 2017. 2017: p. 5471376.
58. Sosnik, A. and K.P. Seremeta, *Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers*. Advances in Colloid and Interface Science, 2015. 223: p. 40-54.
59. Srisuwan, Y. and P. Srihanam, *Preparation and Characterization of Keratin/Alginate Blend Microparticles*. Advances in Materials Science and Engineering, 2018. 2018: p. 8129218.
60. Bose, P.S., et al., *Preparation and evaluation of indomethacin loaded alginate microspheres*. Ceska Slov Farm, 2016. 65(3): p. 104-110.
61. Lin, S.F., et al., *Improving the Stability of Astaxanthin by Microencapsulation in Calcium Alginate Beads*. PLoS One, 2016. 11(4): p. e0153685.
62. Shukla, S., et al., *Formulation and in vitro characterization of alginate microspheres loaded with diloxanide furoate for colon- specific drug delivery*. Asian Journal of Pharmaceutics, 2010. 4.
63. Mali, K., et al., *Sodium alginate microspheres containing multicomponent inclusion complexes of domperidone*. Latin American Journal of Pharmacy, 2010. 29: p. 1199-1207.
64. Silva, C.M., et al., *Alginate microspheres prepared by internal gelation: development and effect on insulin stability*. Int J Pharm, 2006. 311(1-2): p. 1-10.
65. Rajinikanth, P.S., C. Sankar, and B. Mishra, *Sodium alginate microspheres of metoprolol tartrate for intranasal systemic delivery: development and evaluation*. Drug Deliv, 2003. 10(1): p. 21-8.
66. Ching, B., Bhandari,, *Alginate gel particles-A review of production techniques and physical properties*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2017. 57(6): p. 1133-1152.
67. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Alginate: properties and biomedical applications*. Prog Polym Sci, 2012. 37(1): p. 106-126.
68. Baimark, Y. and Y. Srisuwan, *Preparation of Polysaccharide-Based Microspheres by a Water-in-Oil Emulsion Solvent Diffusion Method for Drug Carriers*. International Journal of Polymer Science, 2013. 2013: p. 761870.
69. Zhang, R., et al., *Alginate/laponite hydrogel microspheres co-encapsulating dental pulp stem cells and VEGF for endodontic regeneration*. Acta Biomater, 2020. 113: p. 305-316.
70. Zheng, X., et al., *Omp16-based vaccine encapsulated by alginate-chitosan microspheres provides significant protection against Haemophilus parasuis in mice*. Vaccine, 2017. 35(10): p. 1417-1423.
71. Huang, X., et al., *Microencapsulation of probiotic lactobacilli with shellac as moisture barrier and to allow controlled release*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021. 101(2): p. 726-734.
72. Kim, E.S., J.S. Lee, and H.G. Lee, *Calcium-alginate microparticles for sustained release of catechin prepared via an emulsion gelation technique*. Food Sci Biotechnol, 2016. 25(5): p. 1337-1343.

73. Lupo, B., et al., *Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate cocoa polyphenols*. Food Hydrocolloids, 2014. 38: p. 56-65.
74. Wang, L.Y., G.H. Ma, and Z.G. Su, *Preparation of uniform sized chitosan microspheres by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug*. J Control Release, 2005. 106(1-2): p. 62-75.
75. Zhai, P., X.B. Chen, and D.J. Schreyer, *Preparation and characterization of alginate microspheres for sustained protein delivery within tissue scaffolds*. Biofabrication, 2013. 5(1): p. 015009.
76. Ahmed, M.M., et al., *Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium-sodium alginate microparticles*. Saudi Pharm J, 2013. 21(1): p. 61-9.
77. Lotfipour, F., S. Mirzaeei, and M. Maghsoodi, *Evaluation of the effect of CaCl₂ and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of Lactobacillus acidophilus loaded alginate beads using response surface analysis*. Adv Pharm Bull, 2012. 2(1): p. 71-8.
78. Gedam, S., et al., *EFFECT OF CROSSLINKING AGENT ON DEVELOPMENT OF GASTRORETENTIVE MUCOADHESIVE MICROSPHERES OF RISEDRONATE SODIUM*. International Journal of Applied Pharmaceutics, 2018. 10(4): p. 133-140.
79. Esquisabel, A., et al., *Production of BCG alginate-PLL microcapsules by emulsification/internal gelation*. J Microencapsul, 1997. 14(5): p. 627-38.
80. Quong, D. and R.J. Neufeld, *DNA protection from extracapsular nucleases, within chitosan- or poly-L-lysine-coated alginate beads*. Biotechnol Bioeng, 1998. 60(1): p. 124-34.
81. Vandenberg, G.W. and J. De La Noüe, *Evaluation of protein release from chitosan-alginate microcapsules produced using external or internal gelation*. J Microencapsul, 2001. 18(4): p. 433-41.
82. Jean-Pierre, B., R. Joël, and V.-J. Marie-Claire, *Microencapsulation*. Techniques de l'ingénieur Cosmétiques : procédés de formulation, 2013. base documentaire : TIB634DUO(ref. article : j2210).
83. microencapsulation, C.i., *introduction aux technologies d'encapsulation*. 2016: www.Capsulae.com LINSERER.
84. Tanzina Huqa, C.F.b., Avik Khanc, Bernard Riedl d, Jean Bouchardb, and M. Lacroixa, *Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin*. Carbohydrate Polymers, 2017.
85. VANDAMME Thierry, P.D., SUBRA-PATERNAULT Pascale, *Microencapsulation des sciences aux technologies*. 2007. 348
86. Zhu, Y., *Immobilized cell fermentation for production of chemicals and fuels*. Bioprocessing for value-added products from renewable resources, 2007: p. 373-396.
87. Poe, K., McQuade, *Mechanism and application of a microcapsule enabled multicatalyst reaction*. J Am Chem Soc, 2007. 129(29): p. 9216-21.
88. Duclairoir, C., et al., *Alpha-tocopherol encapsulation and in vitro release from wheat gliadin nanoparticles*. J Microencapsul, 2002. 19(1): p. 53-60.
89. Yoo, S.H., et al., *Microencapsulation of alpha-tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties*. Int J Biol Macromol, 2006. 38(1): p. 25-30.

90. Stevanović, M., et al., *Fabrication, in vitro degradation and the release behaviours of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres containing ascorbic acid*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2007. 59(2): p. 215-23.
91. Chávarri, M., Ares, Ibáñez, Marzo, Villarán Mdel, *Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions*. Int J Food Microbiol, 2010. 142(1-2): p. 185-9.
92. Navarro, F.P., et al., *Lipid nanoparticle vectorization of indocyanine green improves fluorescence imaging for tumor diagnosis and lymph node resection*. J Biomed Nanotechnol, 2012. 8(5): p. 730-41.
93. Okada, *One- and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuporelin acetate*. Adv Drug Deliv Rev, 1997. 28(1): p. 43-70.
94. Plosker, G.L. and R.N. Brogden, *Leuporelin. A review of its pharmacology and therapeutic use in prostatic cancer, endometriosis and other sex hormone-related disorders*. Drugs, 1994. 48(6): p. 930-67.
95. Arrouj , H., *Etude d'un procédé de microencapsulation par émulsification d'un principe actif anti-inflammatoire et caractérisation biopharmaceutique*. 2016, Béjaïa. Université A. Mira
96. Dhamecha, e.a., *Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: Past, present and future*. international Journal of Pharmaceutics, 2019.
97. Benyahia , A.B., *Encapsulation de la doxycycline et de l'aspirine : étude de l'effet des paramètres physicochimiques de préparation sur la stabilité des microcapsules d'alginate*. 2017, Khemis Miliana : Université Djilali Bounaâma.
98. Guirous Houria, *Synthèse et caractérisation de la polycaprolactone* 2011, Université M'hamed Bougara-Boumerdes.
99. Patil, S., *Microencaps* 1997.
100. Dusseault, *Biocompatibilité des Microcapsules d'Alginate : Purification d'Alginate, Réaction Immunitaire de l'Hôte et Protection du Receveur* 2009, Université de Montréal
101. Peiyuan HE, *Conception et réalisation d'un système microfluidique pour la production de gouttes calibrées et leur encapsulation* 2009, Université de Technologie de Compiègne.
102. pharmaceutique, O.d.r., *Hand book of pharmaceutical excipients* 2009.
103. Guendouzen, H.B., Mahdi; Bouchal, Fatiha *Formulation et caractérisation des microparticules à base de bio polymères*. 2017, Université de Béjaïa.
104. Gupta, K.C. and M.N.V. Ravi Kumar, *pH dependent hydrolysis and drug release behavior of chitosan/poly(ethylene glycol) polymer network microspheres*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2001. 12(9): p. 753-759.
105. A.K. Anal, W.F.S., *chitosane-alginate multilayer beads for controled release of ampicilline*. International journal of pharmaceutics, 2005.
106. analyseinstrumentale, c.d.m., *spectroscopie UV-Visible*. Université Ferhat abbas Setif 1.
107. Wikipedia. «*Émulsion*». 2018.
108. Shechter, T., " *différences entre les émulsions huile dans eau et eau dans huile.*" Homogénéisateurs à ultra haute pression BEE International.

109. Clark, P., *Émulsions: quand l'huile et l'eau se mélangent* Qu'est-ce que la science et la technologie de l'alimentation? , 2013.
110. Belščak-Cvitanović, A., Bušić, A., Barišić, L., Vrsaljko, D., Karlović, S., Špoljarić, I., Vojvodić, A., Mršić, G., Komes, D., *Emulsion templated microencapsulation of dandelion (Taraxacum officinale L.) polyphenols and β -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin*. Food Hydrocolloids, 2016.
111. Nguyen Thi Thanh Uyen, Z.A.A.H., Nguyen Xuan Thanh and N.B.A. Tram, *Fabrication of alginate microspheres for drug delivery*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019.
112. Sanchita Mandal, S.K., Balakrishnam Krishnamoorthy, Sanat Kumar Basu, *Development and evaluation of calcium alginate beads prepared by sequential and simultaneous methods*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010.
113. Karina Garcí'a-Gutiérrez , H.c.M.P.-V., Fernando Esparza-Garcí'a , Jorge Ibarra-Rendón ,Josefina Barrera-Cortés, *Small microcapsules of crystal proteins and spores of Bacillus thuringiensis by an emulsification/internal gelation method*. Bioprocess Biosyst Eng, Springer-Verlag, 2011.
114. Aichour, *Synthèse et propriétés de bioadsorbants encapsulés dans l'alginate : application à l'élimination des colorants du milieu aqueux* 2019, Sétif : université Ferhat Abbas.
115. Nafti, *Contribution à l'étude de la cinétique de libération d'un principe actif: oxacilline sodique encapsulé en vue de déterminer les conditions de conservation*. 2008, Djelfa : Université ZIANE Achour
116. DIBENE , F., *Effet du chitosane sur les propriétés des microparticules à base d'un anti-inflammatoire stéroïdien « la prednisone »* 2016, Bejaia : Université Abderrahmane Mira
117. Lin, C., Chen, Chen, Ho, Tsung, Sheu, Liu, *Improving the stability of astaxanthin by microencapsulation in calcium alginate beads*. PloS one, 2016.
118. P. Smrdel, M.B., and A. Mrhar, *The influence of selected parameters on the size and shape of alginate beads prepared by ionotropic gelation (2008)* 2008.
119. Evandro , D., Ramila ,Denis *Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: applications and drawbacks*. Journal of Microencapsulation, 2017.
120. Livia Pinto Heckert Bastos , B.d.S.C., Rodrigo Pinto Siqueira , Edwin Elard Garcia-Rojas *Complex coacervates of β -lactoglobulin/sodium alginate for the microencapsulation of black pepper (Piper nigrum L.) essential oil: Simulated gastrointestinal conditions and modeling release kinetics*. International Journal of Biological Macromolecules, 2020.
121. Keech A, S.R., Barter P, et al, the lancet, 2005.
122. SANDOZ FENOFIBRATE S in MONOGRAPHIE DE PRODUIT. 2009.
123. Takagi, I., H. Shimizu, and T. Yotsuyanagi, *Application of Alginate Gel as a Vehicle for Liposomes. I.Factors Affecting the Loading of Drug-Containing Liposomes and Drug Release*. CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, 1996. 44(10): p. 1941-1947.
124. Kwon, K. and J.C. Kim, *Redox-responsive alginate microsphere containing cystamine*. J Biomater Sci Polym Ed, 2016. 27(15): p. 1520-33.

125. Baimark, Y. and Y. Srisuwan, *Preparation of alginate microspheres by water-in-oil emulsion method for drug delivery: Effect of Ca²⁺ post-cross-linking*. Advanced Powder Technology, 2014. 25: p. 1541-1546.
126. Rahman, Z., et al., *Characterization of 5-fluorouracil microspheres for colonic delivery*. AAPS PharmSciTech, 2006. 7(2): p. E47.

Annexe n°1 : Préparation du Tampon acétate de sodium pH=4.5 pour le procédé de lavage

Le milieu est préparé selon la pharmacopée européenne 7^{ème} édition :

- _ Faire dissoudre 1.8g d'acétate de sodium anhydre dans 250 ml d'eau distillée ;
- _ Ajuster le pH à 4.5 avec 1.6 ml d'acide acétique glaciale ;
- _ Compléter à 1000 ml d'eau distillée.

Annexe n°2 : Préparation des milieux de dissolution pour le test de libération in vitro

Les deux protocoles sont tirés de la pharmacopée américaine USP

➤ Milieu basique Ph=6.8

Un litre du milieu de simulation de fluide intestinal (Simulated Intestinal Fluid, SIF) de Ph=6.8 est préparé en mélangeant 250 ml de potassium phosphate mono sodique 0.2M et 112 ml de soude 0.2M dans une fiole et compléter le volume avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. La solution de potassium monobasique est préparée par dissolution de 27.22g de sa poudre dans un litre d'eau distillée.

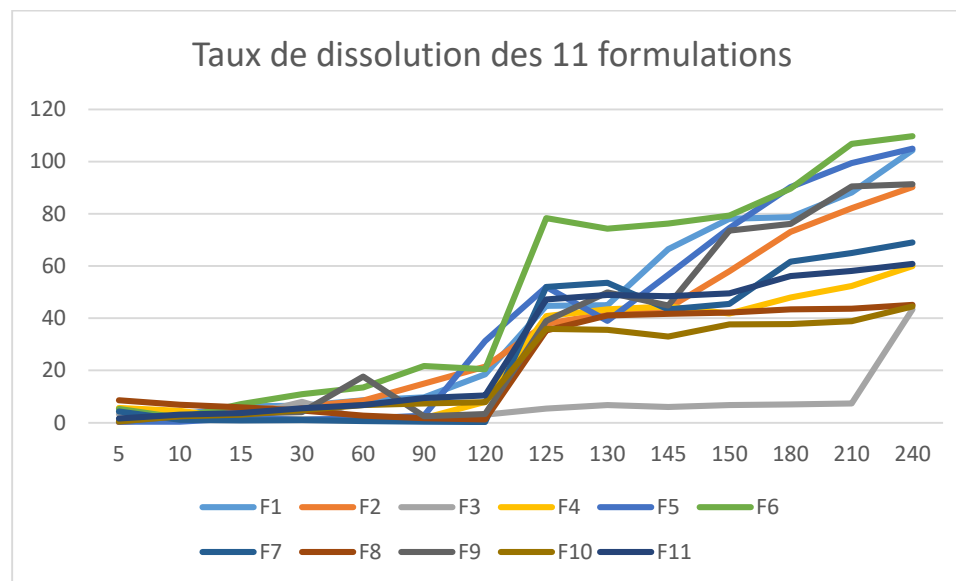
➤ Milieu acide Ph=1.2

Le milieu simulant le fluide gastrique (Simulated Gastric Fluid, SGF) de Ph=1.2 est préparé en ajoutant l'eau distillée à un mélange de 425 ml de HCL 0.2M et 250 ml de chlorure de potassium jusqu'à obtention d'un litre. Ce dernier est préparé par dissolution de 14.91g dans un litre d'eau distillée.

Annexe n°3 : pourcentage de dissolution des 11 formulations

		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
pH=1,2	5	0,233809	0,081741	3,275167	5,708254	0,385877	5,25205	4,339643	8,597544	0,537945	0,537945	1,602421
	10	3,1231	2,058624	1,450353	4,491711	0,385877	1,906556	1,146217	6,924797	2,514828	2,514828	3,1231
	15	6,316526	4,795847	2,210692	1,602421	1,754488	7,076865	0,842081	5,860322	3,427235	3,1231	3,731371
	30	6,468594	6,164458	7,989273	1,298285	1,298285	10,87856	0,994149	4,643779	4,035507	4,795847	5,556186
	60	8,597544	8,445476	1,298285	0,842081	1,602421	13,46372	0,690013	2,666896	17,72162	6,772729	6,772729
	90	9,66202	14,9844	1,602421	1,754488	2,666896	21,67538	0,385877	1,754488	2,514828	7,381001	9,509952
	120	18,48196	21,52332	3,1231	7,989273	31,25566	20,45884	0,233809	1,298285	3,275167	7,837205	10,42236
pH=6,8	125	44,79262	37,89512	5,397415	40,79667	52,01589	78,38454	51,96858	35,36478	38,99846	35,93934	47,26197
	130	45,06591	41,86167	6,802987	43,46653	38,95718	74,24893	53,53169	41,06464	49,95297	35,59641	48,89955
	145	66,52112	43,86604	5,986277	44,46528	56,63306	76,29381	43,40285	41,6434	44,83769	32,96666	48,48652
	150	78,15423	58,02546	6,800043	41,82882	74,5601	79,31989	45,4777	42,24777	73,60698	37,63548	49,50069
	180	78,70333	73,1362	6,998395	47,91462	90,25927	89,62821	61,66097	43,45927	76,0946	37,81456	56,1755
	210	88,21435	82,16957	7,402244	52,33744	99,49212	106,7824	65,0212	43,65563	90,45402	38,82576	58,16633
	240	104,3604	90,22122	43,43108	60,0073	104,9113	109,7329	69,05281	45,07159	91,39432	44,48848	60,78784

Annexe n°4 : graphe représentant le taux de dissolution des 11 formulations.



RESUME

Dans ce travail, des microparticules sont préparées suivant un procédé de gélification par émulsification interne, qui consiste en la réticulation de l'alginate de sodium par des ions de calcium encapsulant ainsi le fénofibrate qui est l'ingrédient actif choisi.

La mise au point de ces microparticules polymériques a permis d'étudier l'influence des paramètres de formulation et du procédé sur leurs propriétés physiques et leurs profils de libération du fénofibrate qu'elles contiennent. L'évaluation des performances de libération du fénofibrate en milieu gastrique pH = 1.2 et intestinal pH = 6.8 simulés, ont montré des profils de libération prolongée et pH-dépendante pour toutes les formulations. La concentration en polymère C1 et la concentration de l'agent réticulant C2 sont les deux paramètres influençant.

Mots clés : Microparticules polymériques, libération prolongée, gélification interne, alginate de sodium, fénofibrate.

ABSTRACT

In this work, microparticles are prepared by an internal emulsification gelation process, which consists in the cross-linking of sodium alginate by calcium ions encapsulating the fenofibrate which is the active ingredient of interest.

The development of these polymeric microparticles led to the study of the influence of formulation and process parameters on their physical properties and release profiles of the fenofibrate that they contain. Evaluation of fenofibrate release performance in simulated gastric pH = 1.2 and intestinal pH = 6.8 fluids exhibited prolonged and pH-dependent release profiles for all formulations. The concentration of polymer C1 and the concentration of cross-linking agent C2 were the two most influencing parameters.

Key words : polymeric microparticles, sustained release, internal gelation, sodium alginate, fenofibrate.