

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الجبالي بونعامة خميس مليانة

Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de la Technologie



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention d'un Diplôme de Master en Génie des Procédés

Spécialité : Génie Pharmaceutique

Thème :

Encapsulation de lysozyme et de la doxycycline : synthèse bibliographique

Présenté par :

AICHOUN Meriem

Devant le jury composé de :

M^{elle} F/Z Slimane..... Présidente

M^{elle} S.Boudergua..... Examinatrice

Mr.O . Larbi BouamraneEncadreur

Année universitaire : 2019/2020



Remerciements

Je remercie en premier lieu Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas fini et compris et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mr. Larbi Bouamrane, je le remercie infiniment.

Mes remerciements s'adressent aux membres de jury M^{elle} Slimane et M^{elle}. Boudergua pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à tous nos enseignants qui ont contribué à notre formation.

Nos profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidées et soutenues de près ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail

DEDICACES



A ma mère qui m'a toujours aidée, encouragée et aimée
infiniment.

A mes chers frères, Samir et Belkacem et mes petites sœurs.

A mes chers amis meriem chadouli, meriem gacem,
rababe, safaa rihab, khadidja, Abir, narimane chaima ,hadjer,
ahlam, meriem khlifi, siham, manel et à toute ma promo M₂
Génie pharmaceutique.

A vous, mes chers amis et à toute ma famille

Aichoun et Boubekour, je dédie ce travail...

MERIEM



Liste des tableaux

Tab I.1	Propriétés physico-chimiques de la doxycycline.....	04
Tab I.2	Présentation des différentes Origines du lysozyme et leur quantité.....	10
Tab II.1	Principaux matériaux d'encapsulation.....	24
Tab II.2	Classification des procédés de microencapsulation.....	27
Tab II.3	Polymères, solvants, agents de coacervation utilisés dans les méthodes d'encapsulation par coacervation.....	29
Tab II.4	Exemples de principes actifs hydrophiles et hydrophobes encapsulés par la méthode de microencapsulation par évaporation de solvant.....	34
Tab III.1	L'influence de différents sels formateurs de phase sur l'activité du lysozyme.....	48
Tab III.2	L'influence du poids de PEG sur l'activité du lysozyme.....	49
Tab III.3	Diamètre d'inhibition des souches testées par le lysozyme	56
Tab.III.4	Caractéristiques des microsphères de lysozyme	58
Tab III.5	Taille des particules obtenues par l'encapsulation de la doxycycline.....	61
Tab.III.6	Efficacité d'encapsulation avec différents groupes terminaux du PLGA.....	64

Liste des figures

Fig.I.1	Molécule de doxycycline.....	03
Fig.I.2	Métalloprotéase matricielle (MMP8) et (MMP9).....	05
Fig.I.3	La famille d'IL-1 (Interleukine 1).....	05
Fig.I.4	L'activité des antibiotiques (Ex: la doxycycline).....	06
Fig.I.5	Les cibles bactériennes des tétracyclines	07
Fig.I.6	Schéma des liaisons entre le NAG et l'ANAM dans le peptidoglycane...	12
Fig.I.7	Structure tertiaire du lysozyme.....	13
Fig.I.8	Présentation de la structure d'une bactérie à Gram positif et bactérie à Gram négatif.....	13
Fig.I.9	Structure du PG et site de clivage du lysozyme.....	14
Fig.I.10	Interaction du lysozyme avec le PG	15
Fig.I.11	Séquence de réaction de glycosyle hydrolase permettant une rétention de configuration anomérique (ex : lysozyme).....	16
Fig.I.12	Séquence de réaction de glycosyle hydrolase inversant la configuration anomérique.....	17
Fig.II.1	Les classes des microparticules et leur microstructure.....	23
Fig.II.2	Principe de l'encapsulation par coacervation.....	29
Fig.II.3	Schéma de principe du procédé d'encapsulation par gélification Thermique.....	31
Fig.II.4	Schéma du procédé de microencapsulation par évaporation de solvant pour principe actif solide ou soluble dans la solution de polymère.....	32
Fig.II.5	Schéma du procédé de microencapsulation par évaporation de solvant pour principe actif non soluble dans la solution de polymère.....	33
Fig.II.6	Mécanisme de formation des microparticules par polymérisation interfaciale.....	36
Fig. II.7	Schématization des types d'enduit à lit fluidisé.....	37
Fig. II.8	Principe de formation de microparticules par la méthode de nébulisation (spray-drying).....	38
Fig.II.9	Libération contrôlée d'un principe actif par diffusion (système réservoir).....	40
Fig. II.10	Libération contrôlée d'un principe actif par diffusion (système matriciel).....	41
Fig.II.11	Libération contrôlée d'un principe actif avec le système biodégradable	42

Liste des figures

Fig III.1	Effet de la valeur du pH sur d'adsorption du lysozyme.....	50
Fig III.2	Effet de pH sur la quantité du lysozyme adsorbé sur des membranes composites immobilisées de colorant-ligand.....	51
Fig III.3	Effet de la valeur de la concentration de NaCl sur d'adsorption du lysozyme.....	52
Fig III.4	Effet de la concentration de NaCl.....	53
Fig III.5	Effet de la température sur la capacité d'adsorption du lysozyme sur la membrane composite immobilisée de Blue-40	54
Fig III.6	Effet de la température sur la capacité d'adsorption du lysozyme sur la membrane composite immobilisée de Red-120.....	55
Fig.III.7	Diamètre d'inhibition du lysozyme sur S.Aureus (a); E.Coli (b)	57
Fig.III.8	MEB de la morphologie des microsphères d'alginate enduit de chitosane. Agrandissement 10k x	59
Fig III.9	Images SEM des microsphères PLGA1 chargées de DOX préparées selon la technique électrospraying	62
Fig.III.10	Image de microsphères PLGA chargées en DOX préparées selon la technique de d'évaporation de solvant (double émulsion)	63
Fig.III.11	L'effet du pH sur la solubilité du DOX	64
Fig.III.12	Spectres FT-IR de a) microsphères de placebo, b) DOX, c) microsphères PLGA2 chargées de DOX.....	65
Fig.III.13	Images SEM des microsphères PLGA1 après 4 jours d'incubation dans PBS.....	66
Fig.III.14	Les changements du poids moléculaire moyen des microsphères PLGA1 pendant le temps d'incubation.....	67
Fig.III.15	Illustration schématique de la dégradation des microsphères PLGA1 terminaison acide et ester et les micrographies SEM corrélées de P2A-D et P2-D après libération de DOX dans le PBS.....	68
Fig.III.16	Cinétique de libération in vitro de microsphères de PLGA2 (5002A)	69
Fig.III.17	(A)Le profil de libération de DOX des microsphères de PLGA1 pendant 6 semaines, (B) zoom avant sur le profil de libération au cours de la première semaine d'incubation.....	69

Symboles et Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
Asp	Acide aspartique
ATB	Antibiotique
ATPS	Aqueous two-phase system
Cys	Cystéine
DCM	Dichlorométhane
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DOX	Doxycycline
EE	Efficacité d'encapsulation
EDTA	Éthylène diamine tétra-acétique
EtOH	Ethanol
FBS	Fœtal sérum bovin
FT-IR	Infrarouge à transformée de Fourier
HPMC	Hydroxypropylméthyl cellulose
HWEL	Lysozyme de blanc d'oeuf de poule
IL	Interleukine
Glu	Acide glutamique
KDa	kilo Dalton
LC	Capacité de charge

Symboles et Abréviations

LYZ	Lysoszyme
MEB	Micrographies électroniques à balayage
Mne	Membrane
NAG	N-acétyl glucosamine
NAM	N-acétyl muramique
PBS	Solution phosphate salin
P-CDP-COO⁻	polymère de β -cyclodextrine poreux à fonction carboxyle
PEG	Polyéthylène glycol
pH	Potentiel d'hydrogène
PG	Peptidoglycane
PLGA	Poly (lactic-co-glycolic acid)
PVA	Alcool polyvinylique
RB-4	Réactif bleu-4
RR-120	Réactif rouge-120
SEM	Microscope électronique à balayage
Vd	volume de distribution
	Alpha
Å	Angstrom
β	Béta

في هذه الدراسة ، تم التخطيط لإجراء بحث عن المادتين المضادتين للبكتيريا ، وهما الليزوزيم والدوكسيسيكليين ، ومعرفة مدى فعالية تغليفهما في المصفوفات البوليمرية. اتضح أن تحضير الليزوزيم من بيضة الدجاج وتغليفه ممكن عمليًا. في خطوة استخراجها ، يتم أخذ العديد من المعلمات في الاعتبار ، طبيعة وتركيز الملح ، ودرجة الحموضة. لذلك يبدو أنه يمكن استخدام هذه المادة في العلاجات ضد الالتهابات البكتيرية. وبالمثل ، يمكن صياغة الدوكسيسيكليين كمضاد حيوي من التتراسيكليين كجزيئات فردية بهدف تقليل الآثار الجانبية للشكل التقليدي. بالإضافة إلى ذلك ، يجب أن يتم اختيار مادة التغليف وفقًا لطريقة التحضير المخطط لها.

المفتاحية: ليزوزيم ، دوكسيسيكليين ، تغليف ، بوليمر ، إطلاق متحكم فيه .

The summary:

In this study, it is planned to carry out a literature search on the two antibacterial substances, namely lysozyme and doxycycline, and to see the efficiency of their encapsulation in polymeric matrix. It turns out that the preparation of lysozyme from the chicken egg and its encapsulation is practically possible. In the step of its extraction, several parameters are considered, the nature and concentration of the salt, the pH. It thus emerges that this substance can be considered for use in therapeutic treatments against bacterial infections. Likewise, doxycycline as a tetracycline antibiotic can be formulated as individualized particles with the aim of reducing the side effects of the conventional form.

In addition, the choice of the encapsulation material must be made according to the envisaged preparation method

Keywords: Lysozyme, doxycycline, encapsulation, polymer, controlled release.

Le résumé :

Dans cette étude, il est envisagé d'effectuer une recherche bibliographique relative aux deux substances antibactériennes en l'occurrence le lysozyme et la doxycycline et de voir l'efficacité de leur encapsulation dans des matrices polymériques. Il s'avère que la préparation du lysozyme à partir de l'œuf de poule et de son encapsulation est pratiquement possible. Dans

Résumé

l'étape de son extraction, plusieurs paramètres sont considérés, la nature et la concentration du sel, le pH. Il ressort ainsi que cette substance peut être envisagée pour qu'elle soit utilisée dans les traitements thérapeutiques contre les infections bactériennes. De même, la doxycycline comme antibiotique des tétracyclines peut être formulée sous forme de particules individualisées dans l'objectif de réduire les effets secondaires de la forme conventionnelle.

Par ailleurs, le choix du matériau d'encapsulation doit être effectué en fonction de la méthode de préparation envisagée.

Les mots clés: Lysozyme, doxycycline, encapsulation , polymère, libération contrôlée.

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Symboles et abréviations

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale..... 01

Chapitre I : Généralité sur la doxycycline et le lysozyme

I.1. Introduction..... **03**

I.2. Doxycycline..... 03

I.2.1. Définition et classification de la doxycycline..... 03

I.2.2. Propriétés physico-chimiques..... 04

I.2.3. Effet pharmacologique..... 04

I.2.4. Mécanisme d'action de la doxycycline..... 06

I.2.5. Pharmacologie de la doxycycline..... 07

I.2.5.1. Pharmacocinétique..... 07

I.2.5.1.1. Administration..... 07

I.2.5.1.2. Distribution 08

I.2.5.1.3. Métabolisme..... 08

I.2.5.1.4. Elimination..... 08

I.2.5.2. Pharmacodynamique..... 08

I.2.6. Indications de la doxycycline..... 09

I.2.7. Contre-indications..... 09

I.2.8. Effets secondaires..... 09

I.3. Lysozyme..... 10

I.3.1. Définition..... 10

I.3.2. Etapes importantes dans la découverte du lysozyme..... 11

I.3.3. Structure du lysozyme..... 12

I.3.4. Fonction du lysozyme..... 13

I.3.5. Propriétés biochimiques du lysozyme..... 14

I.3.6. Mécanisme d'action du lysozyme..... 14

Sommaire

I.3.7. Domaine d'application.....	17
I.3.8. Méthodes d'extraction de lysozyme.....	18
I.3.8.1. Système biphasé aqueux (ATPS).....	18
I.3.8.2 Adsorption.....	18
I.3.8.3. Chromatographie colorant-ligand.....	19
I.4. Conclusion.....	20

Chapitre II : L'encapsulation

II.1. Introduction	22
II.2. Généralité.....	22
II.3. Types des particules.	22
II.4. Matériaux d'encapsulation.....	23
II.5. Composées encapsulées.....	25
II.6. Objectifs.....	25
II.7. Avantages et inconvénients de l'encapsulation.....	26
II.7.1. Avantages.....	26
II.7.2. Inconvénients.....	26
II.8. Procédés de microencapsulation.....	27
II.8.1. Procédés physico-chimiques.....	29
II.8.1.1. Techniques de coacervation.....	29
II.8.1.2. Technique de gélification thermique ou Hot-melt.....	30
II.8.1.3. Technique par évaporation de solvant.....	31
II.8.2. Procédés chimiques.....	35
II.8.2.1. Encapsulation par polymérisation interfaciale.....	35
II.8.2.2. Microencapsulation par polymérisation in situ.....	36
II.8.3. Procédés mécaniques.....	37
II.8.3.1. Lit d'air fluidisé.....	37
II.8.3.2. Nébulisation.....	38
II.9. Libération contrôlée.....	39
II.9.1. Généralités.....	39
II.9.2. Mécanisme de libération	39
II.9.2.1. Par diffusion.....	39
II.9.2.1.1. Système réservoir.....	40
II.9.2.1.2. Système matriciel (monolithique).....	40

Sommaire

II.9.2.2. Par érosion.....	41
II.9.2.3. Par éclatement.....	42
II.9.3. Cinétique de libération.....	43
II.9.4. Avantages et inconvénients de la libération contrôlée.....	44
II.9.4.1. Avantage	44
II.9.4.2. Inconvénients.....	44
II.10. Conclusion.....	44

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Introduction.....	46
III.2. Matériels et méthodes	46
III.3. Résultats et discussion	48
III.3.1. Extraction du lysozyme d'œuf de poule.....	48
III.3.1.1. Effet du type de sel formateur de phase.....	48
III.3.1.2. Effet du poids moléculaire de PEG.....	48
III.3.1.3. Effet de pH	49
III.3.1.4. Effet de la concentration de NaCl.....	52
III.3.1.5. Effet de température	53
III.3.1.6. Evaluation de l'activité antibactérienne de lysozyme	55
III.3.2. Microencapsulation de la doxycycline et de lysozyme.....	57
III.3.2.1. Microencapsulation de lysozyme	57
III.3.2.1.1. Caractéristiques des particules de lysozyme	58
III.3.2.1.2. Efficacité d'encapsulation.....	58
III.3.2.1.3. Libération de lysozyme	60
III.3.2.2. Microencapsulation de la doxycycline	61
III.3.2.2.1. Efficacité d'encapsulation	63
III.3.2.2.2. Caractéristiques des microsphères de lysozyme.....	65
III.3.2.2.3. Test de dégradation de microsphères PLGA1.....	66
III.3.2.2.4. Cinétique de libération de doxycycline in vitro.....	69
III.3.3. Conclusion.....	70
Conclusion générale.....	73

Liste des références bibliographiques



Introduction générale



Introduction générale

Introduction générale :

Les médicaments sont des produits pharmaceutiques utilisés dans la prévention, le diagnostic et le traitement des maladies. Ces médicaments sont présentés en formes diverses solides (comprimés, gélules, etc.) ou liquides (solutions, émulsions, etc.).

Pour la majorité des produits pharmaceutiques actuellement utilisés, la spécificité et l'activité des produits pharmaceutiques vers les sites de la maladie ou les maladies individuelles est généralement basé sur la capacité des principes actifs à interférer avec les processus pathologiques locaux ou avec des voies biologiques, mais pas sur son accumulation sélective dans le compartiment intracellulaire spécifique ou dans la cellule, l'organe ou le tissu cibles. Habituellement, les agents pharmaceutiques, pratiquement indépendamment de la voie d'administration, sont distribués dans le corps proportionnellement au flux sanguin régional et d'une façon uniforme. De plus, pour atteindre le site d'action, le principe actif doit franchir de nombreuses barrières biologiques, telles que les organes, les cellules et les compartiments intracellulaires, où il peut être inactivé ou peut causer des effets indésirables sur les organes et tissus qui ne sont pas impliqués dans le processus pathologique. En conséquence, pour atteindre une concentration thérapeutique requise d'un principe actif médicamenteux dans un compartiment corporel ou dans les tissus, il faut administrer le médicament en grandes quantités dont la majeure partie peut être gaspillée dans les tissus normaux, tandis que les agents cytotoxiques et / ou antigéniques / immunogènes peuvent devenir la cause de nombreux effets secondaires négatifs [1]. Ainsi pour y remédier à toutes ces anomalies, le ciblage des médicaments devient une solution très attendue. Le ciblage, considéré comme une libération contrôlée du médicament au niveau du site recherché, est une accumulation accrue d'un principe actif pharmaceutique (PAP) dans la zone requise du corps par rapport à d'autres tissus et organes, indépendamment du site et de la méthode de son administration. Cette méthode offre de nombreux avantages par rapport aux formes galéniques conventionnelles une efficacité améliorée, les protocoles d'administration seront plus simples, la quantité de médicament nécessaire pour atteindre un effet thérapeutique sera considérablement réduite et les effets secondaires seront fortement amoindris [2].

La libération contrôlée d'un médicament est un but auquel la technologie d'encapsulation tend à obtenir.

Introduction générale

L'encapsulation, est une technologie de formulation de particules ayant comme objectif le ciblage et la libération contrôlée d'un principe actif pharmaceutique. Cette technologie conduit au piégeage du principe actif dans un système réservoir ou matriciel en le protégeant des altérations qui peuvent être causées par l'environnement extérieur et augmentant potentiellement sa sélectivité pour les cellules à traiter. Selon les propriétés physico chimiques, l'encapsulation peut être adaptée pour chaque agent actif en faisant le choix pour un matériau convenable (les cires, les protéines, les phospholipides ou encore les polymères). L'encapsulation est une technologie qui se trouve appliquée dans divers domaines : cosmétique, agroalimentaire biomédical et pharmaceutique [3].

La doxycycline, antibiotique de la famille des tétracyclines de deuxième génération présente une activité antibactérienne sur les bactéries à Gram-positives et Gram-négatives. Elle est produite et commercialisée sous forme de comprimés.

Le lysozyme est une protéine globulaire, connue pour sa capacité à dégrader le polysaccharide de nombreux types de parois cellulaires, pour la protection contre les infections bactériennes.

Dans l'objectif de voir la synergie antibactérienne des deux substances et en absence d'étude expérimentale en raison de la pandémie qui sévit dans le monde, nous avons choisi de faire une synthèse des travaux relatifs à ces deux substances et leur encapsulation. Pour ce faire, on a structuré notre manuscrit de la façon suivante :

Un premier chapitre est dédié à une revue générale sur les deux substances antibactériennes, la doxycycline et le lysozyme.

Un deuxième chapitre est consacré à la description de la technologie d'encapsulation et la libération contrôlée.

Un troisième chapitre est réservé aux résultats des travaux expérimentaux de travaux antérieurs.

Enfin, on termine cette revue bibliographique par une conclusion générale.



Chapitre I: Généralités sur la doxycycline et le lysozyme



I.1. Introduction :

La doxycycline est une molécule de la famille des cyclines utilisée comme médicament antibiotique. Grâce aux ses propriétés physico-chimiques et sa pharmacologie, la doxycycline devenir très répondeue dans le domaine pharmaceutique pour traiter de nombreuses maladies infectieuses.

D'autre part, il y a le lysozyme considéré comme protéine globulaire qui présente aussi une action antibactérienne contre les bactéries à Gram-positives beaucoup plus. Il est actif sur une large gamme de température est de pH, ce qui facilite son utilisation. Le lysozyme se trouve dans différentes sources, mais celle du blanc d'œuf de la poule présente notre point d'intérêt. Il existe plusieurs méthodes d'obtention de cette protéine de blanc d'œuf, dont sa quantité extraite se diffère de l'une aux autres.

I.2. Doxycycline :

I.2.1. Définition et classification de la doxycycline:

La doxycycline est l'a-6-déoxy-5oxytétracycline de la formule moléculaire « $C_{22}H_{24}N_2O_8$ ». C'est un isomère structural hémi-synthétique de la famille des tétracyclines de deuxième génération, qui présente un large spectre d'action sur des bactéries à Gram positif et négatif, des germes intracellulaires et sur *Plasmodium*.

Elle possède une activité antibactérienne bactériostatique sur la plupart des bactéries, ainsi qu'une action anti inflammatoire. La doxycycline est utilisée à la fois en médecine vétérinaires et humains [4].

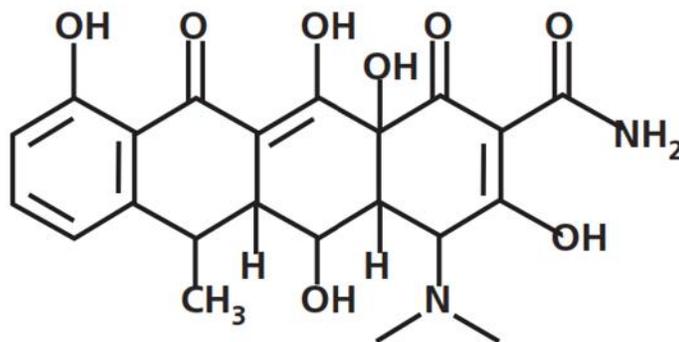


Fig.I.1. Molécule de doxycycline [4].

La doxycycline se présente sous trois formes : hyclate, monohydrate et chlorhydrate. La doxycycline hyclate est la forme hémihydrate et hemiethanolate. Sa description est hygroscopique jaune poudre cristalline, doivent être stockés dans des récipients étanches à l'air et à l'abri de la lumière.

De la doxycycline hyclate, il est possible d'obtenir d'autres formes. La manière dont l'hyclate est dissous dans l'eau et neutralisé par l'hydroxyde de sodium devient doxycycline monohydraté. Cette forme avec l'ajout d'acide chlorhydrique devient chlorhydrate de doxycycline. Le Pourcentage sous forme d'hyclate de doxycycline est de 86,6%, sous forme de chlorhydrate de 89,1% et sous forme de monohydrate de 96,1% [5].

I.2.2. Propriétés physico-chimiques :

Les propriétés physicochimiques de la doxycycline sont reportées dans le tableau I.1.

Tab.I.1. Propriétés physico-chimiques de la doxycycline [6].

Masse molaire	444,43 g/mol
T° fusion	201°C
Solubilité dans l'eau	0,63 mg/ml à (25°C)
Surface polaire	181.62 Å ²
Réfractivité	113.89 m ³ .mol ⁻¹
Polarisabilité	43.65 Å ³
PKa	pK ₁ =3,50 pK ₂ =7,70 pK ₃ =9,50

I.2.3. Effet pharmacologique

La doxycycline inhibe la phorbol-12-myristate-13-acétate métalloprotéase matricielle 8 (MMP-8) et MMP-9 dans les cellules endothéliales humaines [7]. La doxycycline diminue également la dégradation d'élastine et réduit l'activité MMP dans un modèle d'anévrisme maladie [8].

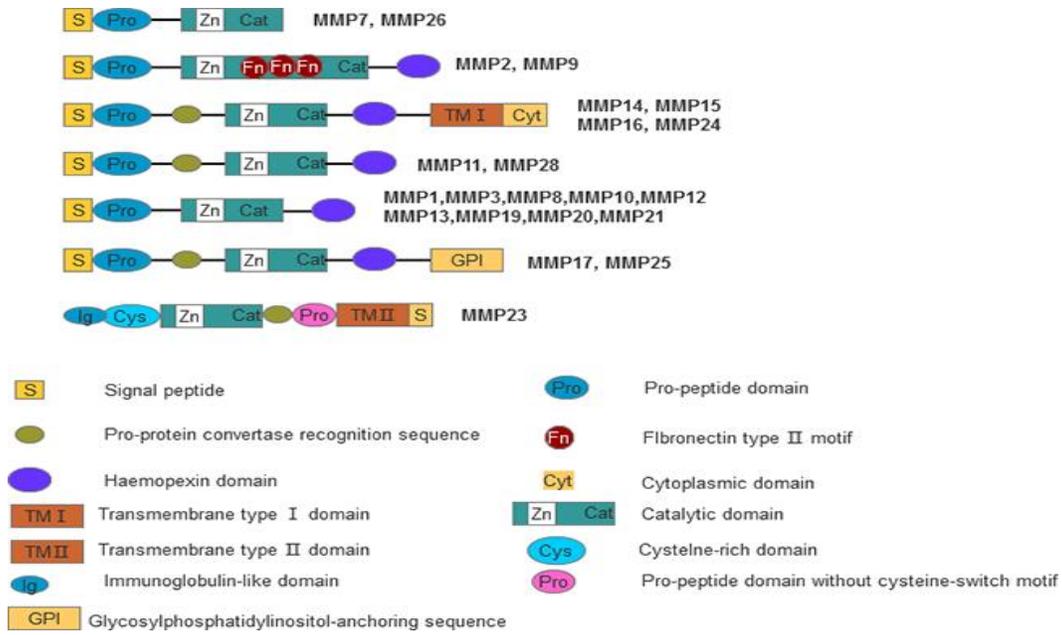


Fig.I.2. métalloprotéase matricielle (MMP8) et (MMP9) [9].

Plus récemment, il a été démontré que la doxycycline inhibe la production d'IL-1 β (Interleukine 1) dans les lipopolysaccharides traités les cultures épithéliales cornéennes dans une mesure comparable à celle atteinte par les corticostéroïdes [10].

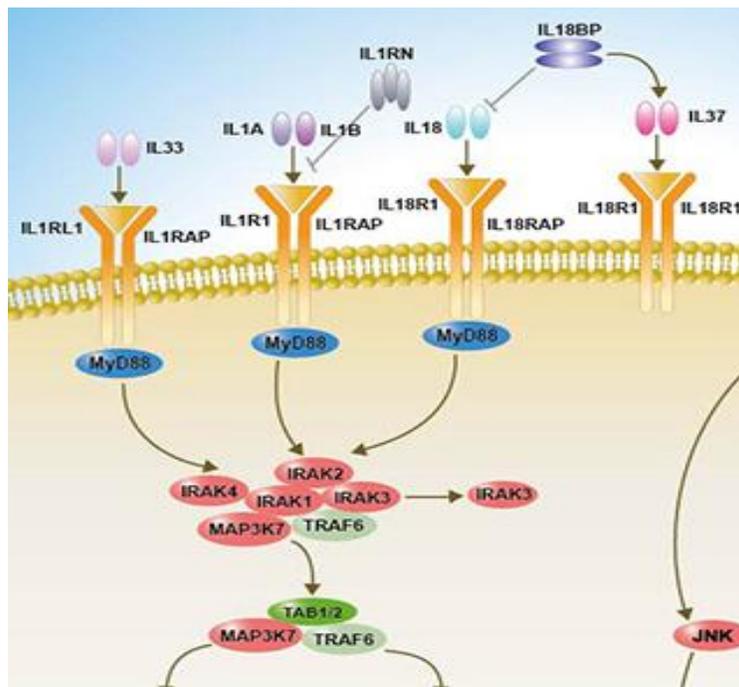


Fig.I.3. La famille d'IL-1 (Interleukine 1) [11].

In vivo, la doxycycline protège la souris de l'endotoxémie mortelle en régulant à la baisse la cytokine et la sécrétion de nitrate dans le sang [12].

I.2.4. Mécanisme d'action:

La première étape de l'entrée des tétracyclines est une diffusion passive à travers la membrane externe des bactéries à gram négatif soit par les pores, soit directement à travers la couche lipidique ; elle est suivie par le passage au travers du peptidoglycane, ensuite un passage à travers la membrane cytoplasmique [13].

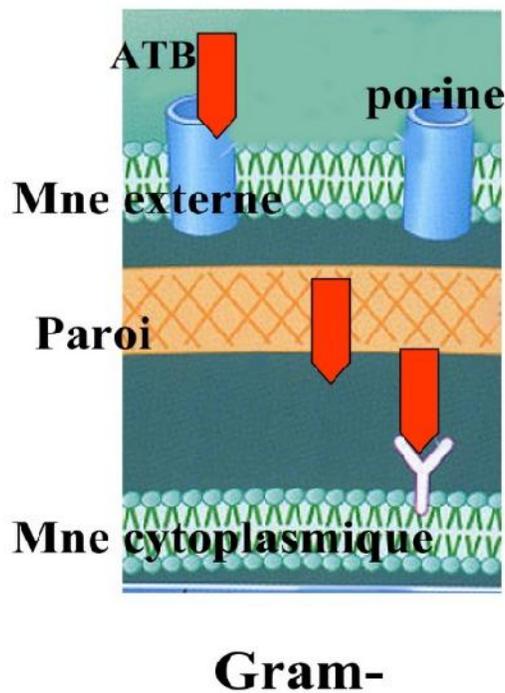


Fig.I.4. L'activité des antibiotiques (Ex: la doxycycline) [14].

Dans la réplication bactérienne, une interaction qui est importante pour l'initiation de la traduction des protéines se produit à l'extrémité « 3 » de l'ARNr 16S, trouvé sur le ribosome sur la sous-unité 30S.

La sous-unité 30S est la plus petite sous-unité du ribosome des procaryotes, y compris les bactéries [15].

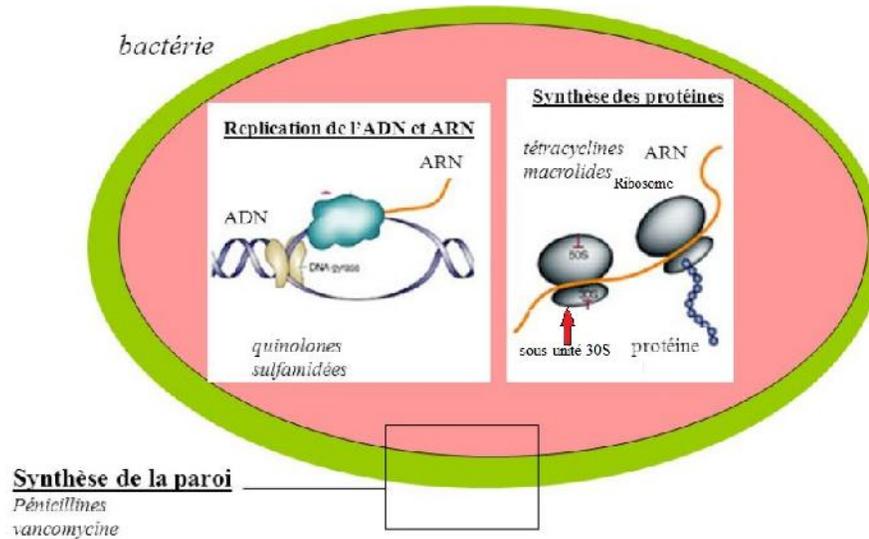


Fig.I.5. Cibles bactériennes des tétracyclines [16].

Les tétracyclines telles que la doxycycline empêchent la fixation de l'ARNt sur son site accepteur et inhibent la traduction en se liant à la partie ARNr 16S du ribosome.

En conséquence des actions ci-dessus, l'initiation de la synthèse des protéines par formation de polyribosomes est bloquée. Cela arrête la réplication des bactéries et produit un effet bactériostatique [17].

I.2.5. Pharmacologie de la doxycycline :

I.2.5.1. Pharmacocinétique :

I.2.5.1.1. Administration :

Après administration orale, la doxycycline est rapidement absorbée à 95% au niveau du duodénum [18], sans interférence avec l'alimentation, à l'exception du lait qui diminue les concentrations plasmatiques maximales et l'absorption de 30% [19].

La prise concomitante de certains médicaments entraîne une diminution de la biodisponibilité (Sels de fer et de zinc et topiques gastro-intestinaux) ou une diminution de la demi-vie (ranitidine et didanosine). Ces médicaments doivent être administrés à distance de la doxycycline, si possible à plus de deux heures d'intervalle [20].

Fortement liée aux protéines plasmatiques (82 à 93%) ce qui produit une demi-vie plus longue (16,33 h), la doxycycline n'est pas dialysable, l'épuration par hémodialyse ne modifiant ni les taux sanguins ni la demi vie de la molécule.

I.2.5.1.2. Distribution :

Par rapport aux autres tétracyclines, la doxycycline est plus lipophile, donc la distribution tissulaire est rapide et large ($V_d = 0,7 \text{ L / kg}$), avec une forte affinité pour les reins, les poumons et la vésicule biliaire, et une faible diffusion dans le liquide céphalorachidien (Augmentée en cas d'inflammation méningée) [21].

L'affinité de la doxycycline pour les os et les dents en période de croissance est plus faible que celle des autres tétracyclines. Néanmoins, le risque d'anomalie du bourgeon dentaire ou de dyschromie et d'hypoplasie de l'émail dentaire contre-indique son utilisation chez l'enfant de moins de 8 ans, pendant les deux derniers trimestres de la grossesse (passage transplacentaire) et chez la femme allaitante (passage dans le lait).

I.2.5.1.3. Métabolisme :

La doxycycline fait l'objet d'un métabolisme hépatique, augmenté par les anticonvulsivants inducteurs enzymatiques. Elle peut également diminuer l'effet des contraceptifs oraux, augmenter les taux sanguins de ciclosporine et potentialiser la toxicité du méthotrexate.

I.2.5.1.4. Elimination :

La demi-vie d'élimination de la doxycycline est de 3 jours (72 h) avec 40% de la dose administrée éliminés sous forme active dans les urines et environ 32% dans les fèces. Contrairement aux autres tétracyclines, la doxycycline peut être prescrite même en cas d'insuffisance rénale sévère, l'excrétion biliaire prenant alors le relais de l'élimination urinaire sans modification de la demi-vie [22].

I.2.5.2. Pharmacodynamique :

La doxycycline a une activité bactériostatique intracellulaire ribosomale. Les bactéries aérobies à Gram positif et les bactéries anaérobies sont généralement sensibles, ainsi que *les*

rickettsies, les chlamydiae et les spirochètes. La doxycycline est également active sur plusieurs bactéries aérobies Gram négatif telles que *Haemophilus influenzae*, *Neisseria*, *Brucella*, *Bacillus anthracis*, mais certaines espèces possèdent une résistance intrinsèque : *Acinetobacter*, *Proteus* et *Pseudomonas*.

Les principaux mécanismes de résistance sont essentiellement acquis et liés soit à une altération de la cible intracellulaire (ribosome), soit à une inhibition de l'absorption de l'antibiotique par modification de la membrane cellulaire (résistance plasmidique). Une porine déficiente est la cause de la résistance chez les bactéries Gram négatif.

La doxycycline présente également une activité anti-parasitaire sur *Plasmodium*. Elle inhiberait notamment la synthèse protéique mitochondriale Parasitaire. Les cyclines ont également une activité anti-inflammatoire, mise à profit dans certaines pathologies dermatologiques [23].

I.2.6. Indications de la doxycycline :

De nombreuses maladies infectieuses répondent à la doxycycline : la brucellose, la pasteurellose, la borréliose, les rickettsioses, les trépanomatoses, le choléra, la leptospirose, la fièvre Q, les infections pulmonaires et génito-urinaires à *Chlamydia* et à *Mycoplasmes*, les gonococcies et la maladie du charbon. La doxycycline possède également une activité antiparasitaire sur *Plasmodium*. En dermatologie, la doxycycline est indiquée dans l'acné et la rosacée [9].

I.2.7. Contre-indications :

Outre les contre-indications précitées, la doxycycline est contre-indiquée en cas d'allergie aux cyclines. Les patients sous traitement par anti-vitamine K doivent faire l'objet d'une surveillance rapprochée de l'International Normalized Ratio (INR) afin d'adapter, si nécessaire, la posologie du traitement anticoagulant pendant et après le traitement antibiotique [24].

I.2.8. Effets secondaires :

Les effets secondaires de la doxycycline sont peu fréquents et conduisent rarement à l'arrêt du traitement. Des troubles digestifs sont souvent décrits lors de la prise per os (nausées, vomissements et douleurs abdominales). Depuis l'introduction d'un sel monohydraté et la

suppression de la forme gélule, les cas d'œsophagites et d'ulcérations ne sont pratiquement plus rapportés [25]. Comme toutes les cyclines, la doxycycline est photo-sensibilisante, la phototoxicité étant dose-dépendante.

Elle peut également induire une photo-onycholyse [26]. Des réactions cutanées à mécanisme immunologique ont été rarement rapportées : angioedème, érythème polymorphe, exanthème maculo-papuleux, dermatite exfoliative. Des cas d'érythème pigmenté fixe ont permis d'observer une sensibilité croisée avec la minocycline.

Plusieurs cas documentant l'aggravation et le déclenchement de novo d'un psoriasis par la doxycycline ont également été publiés. Des accidents graves et exceptionnels ont aussi été décrits : pustulose exanthématique aiguë généralisée et syndrome de Stevens-Johnson. Des candidoses vaginales peuvent survenir chez environ 1 % des femmes. Des maux de tête, des troubles du sommeil, ainsi que de rares cas d'anémie hémolytique, de thrombopénie, de neutropénie ou d'éosinophilie ont été rapportés. [27]

I.3. Lysozyme:

1.3.1. Définition:

Le lysozyme ou « muramidase » est une protéine globulaire de 129 acides aminés, connue pour sa capacité à dégrader l'architecture polysaccharidique de nombreux types de parois cellulaires, pour la protection contre les infections bactériennes [28]. Il est trouvé dans plusieurs sources telles que les sécrétions du corps humain (larmes, les sécrétions nasales et la salive), dans les tissus végétaux et chez les animaux de grandes proportions dans le blanc d'œuf de poule [29]. Le tableau suivant indique les différentes sources de lysozyme et leurs quantités.

Tab.I.2. Présentation des différentes Origines du lysozyme et leur quantité [30].

Source du lysozyme	Quantité de lysozyme (mg/l)
Œuf de poule (blanc)	3000-5000
Larmes humaine	7000

Salive humaine	150-200
Lait maternel	15-500
Lait de vache	0.13-0.3
Jus de chou-fleur	28

Le lysozyme subdivise en trois types :

- J Type « **C** » ou (chiken) : la plupart des Vertébrés dont les Mammifères ; archétype : c'est le lysozyme du blanc d'œuf de poule (le plus intéressant dans cette étude).
- J Type « **g** » ou (Gosse) : décrit initialement dans le blanc d'œuf d'oie, aussi dans les œufs de nombreuses espèces d'oiseaux, majoritairement avec le lysozyme de type C.
- J Type « **i** » ou (invertébré) : première séquence décrite chez un mollusque bivalve marin *Tapes japonica*, il est présent au moins dans les phylums des Mollusques, Annélides, échinodermes, Nématodes et Arthropodes [31].

I.3.2. Etapes importantes dans la découverte du lysozyme

L'activité antibactérienne du blanc d'œuf de poule a été décrite pour la première fois par *Laschtschenko* en 1909. Il a été caractérisé et nommé «**lysozyme**» par *Alexander Fleming*, la même personne créditée pour la découverte de la pénicilline [32]. La découverte de l'activité enzymatique a été accidentelle; au cours de l'expérience sans rapport, des gouttes nasales ont été introduites par inadvertance dans une boîte de Pétri contenant une culture bactérienne, laquelle culture a par conséquent présenté les résultats d'une réaction enzymatique encore inconnue. L'observation de cette réaction inconnue a conduit à des recherches supplémentaires sur les composants de cette réaction ainsi qu'à l'identification correspondante du nouveau «lysozyme». En 1965, *David C. Phillips* et ses collègues ont déterminé la structure tridimensionnelle du lysozyme à une résolution de 2 Å [33]. Le travail de Phillips était particulièrement révolutionnaire puisque Phillips avait réussi à élucider la structure d'une enzyme par cristallographie aux rayons X - un exploit qui n'avait jamais été accompli auparavant. Les recherches de Phillips ont également conduit à une hypothèse structurelle de son mécanisme d'action [34].

I.3.3. Structure :

Le lysozyme est un polypeptide à chaîne unique de 129 acides aminés (chez la poule) réticulés avec quatre ponts disulfures. Il hydrolyse les liaisons β (1-4) entre l'acide N-acétyl-muraminique et les résidus de N-acétyl-D-glucosamine dans le peptidoglycane et entre les résidus de N-acétyl-D-glucosamine dans la chitodextrine [35].

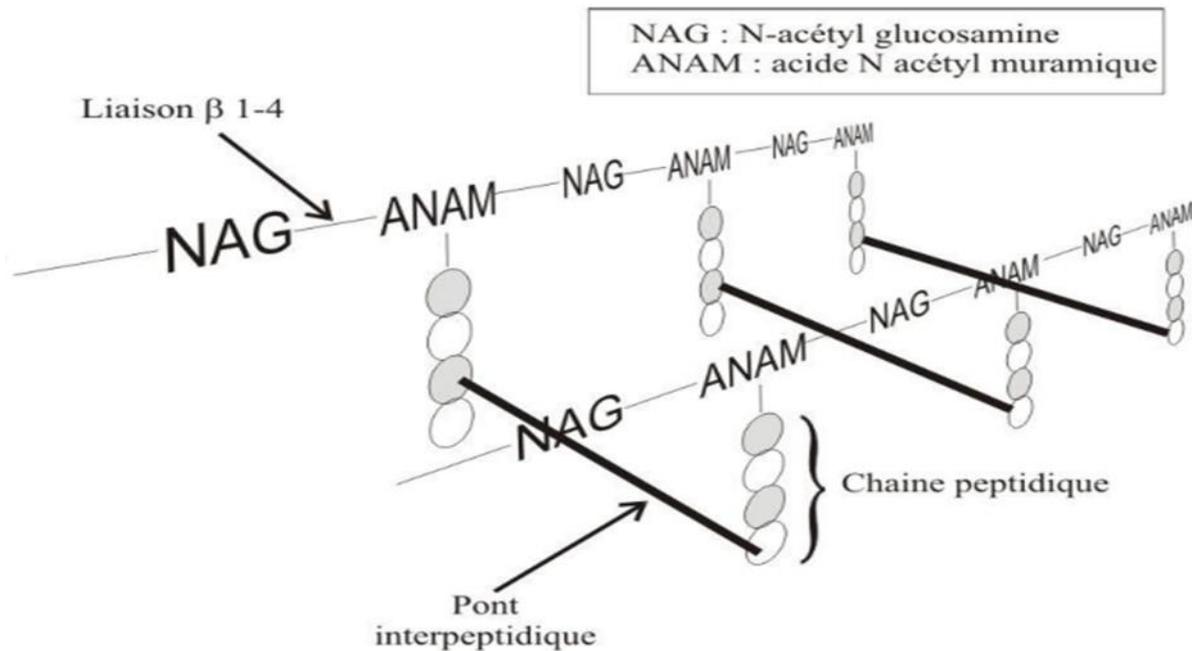


Fig.I.6. Schéma des liaisons entre le NAG et l'ANAM dans le peptidoglycane [36].

La structure tridimensionnelle du lysozyme s'organise en deux domaines séparés par un «Sillon» : Un de ces deux domaines, dénommé domaine I, est constitué majoritairement d'hélice α , alors que le second domaine, dénommé domaine II, se compose d'une hélice α et d'un feuillet antiparallèle constitué de trois brins [30].

Cette structure est stabilisée par quatre ponts disulfures. Trois de ces ponts disulfures impliquant les résidus : Cys6-Cys127, Cys30-Cys115, Cys64-Cys80 du lysozyme sont des ponts disulfures intra domaines : les deux premiers se situent au niveau du domaine I et le troisième au niveau du domaine II. Le quatrième pont disulfure impliquant le résidu Cys76-Cys94 du lysozyme est un pont disulfure entre les domaines I et II [29].

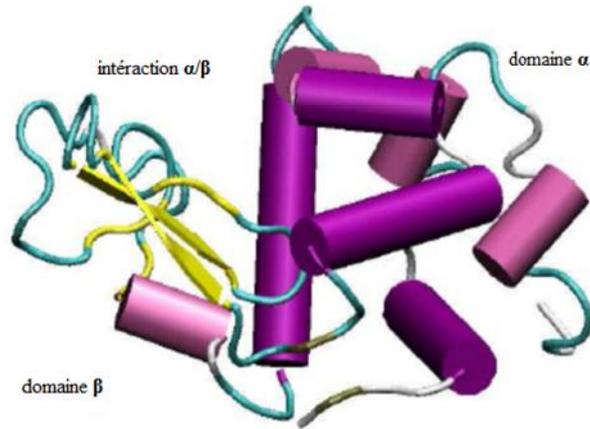


Fig.I.7. Structure tertiaire du lysozyme [30].

I.3.4. Fonction du lysozyme :

L'enzyme est souvent utilisée pour lyser les cellules bactériennes en hydrolysant le peptidoglycane présent dans les parois cellulaires. Les cellules à Gram-positives sont assez sensibles à cette hydrolyse car leurs parois cellulaires ont une forte proportion de peptidoglycane. Les bactéries à Gram négatif sont moins sensibles en raison de la présence d'une membrane externe et une proportion inférieure de peptidoglycane. Cependant, ces cellules peuvent être hydrolysées plus facilement en présence d'EDTA qui chélate les ions métalliques dans la membrane bactérienne externe [37].

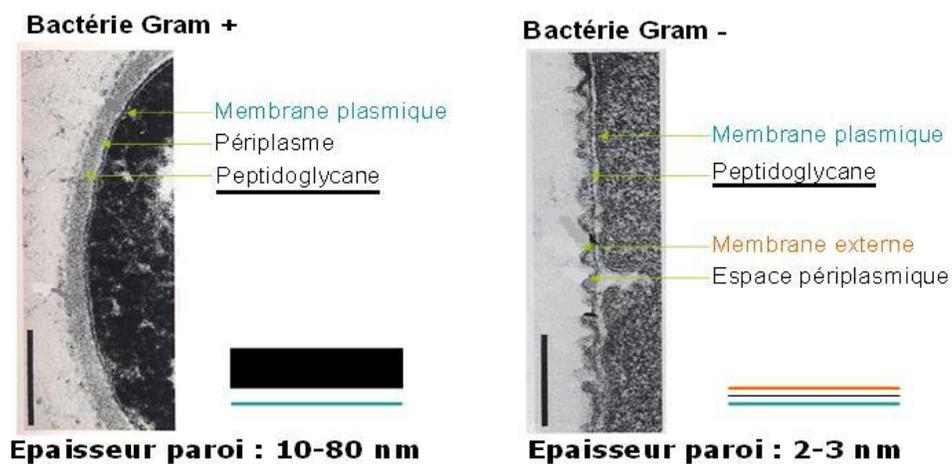


Fig.I.8. Présentation de la structure d'une bactérie à Gram positif et bactérie à Gram négatif [38]

I.3.5. Propriétés biochimiques du lysozyme :

Le lysozyme se compose d'un cœur hydrophobe et d'une couronne hydrophile. Son activité enzymatique dépend évidemment, des facteurs environnementaux tels que le pH, la température et la pression osmotique. Ces dépendances sont différentes pour chaque type de lysozyme [29]. L'activité du lysozyme est une fonction à la fois du pH et de la force ionique. L'enzyme est active sur une large gamme de pH (6,0–9,0). À pH 6,2, l'activité maximale est observée sur une plus large gamme de forces ioniques (0,02–0,100 M) qu'à pH 9,2 (0,01–0,06 M) [39].

Cette enzyme est très stable dans une large gamme de température. Le lysozyme en poudre peut être conservé pendant de longues périodes (plus de 6 mois) à des températures supérieures à 30 °C sans perdre de son activité. Comme le HEWL (Hen Egg white Lysozyme) comporte 4 ponts disulfures entre les cystéines 6-127, 30-115, 64-80 et 76-94, cette molécule est inhabituellement compacte et considérablement thermostable. La présence des ponts disulfure explique aussi la capacité du lysozyme à résister aux hautes pressions. Le lysozyme fait aussi partie des rares enzymes ayant un goût sucré. Des expériences de mutagenèse dirigée ont d'ailleurs été effectuées afin de déterminer par quels mécanismes. Cette protéine active les récepteurs du goût [29].

Masse molaire : 14,3 kDa = 14300 g/mol [40]. Point isoélectrique (pI): 11.35 [41].

I.3.6. Mécanisme d'action du lysozyme :

Comme indiqué ci-dessus, le lysozyme est une enzyme qui digère la paroi cellulaire des bactéries, en coupant le lien glycosidique (1-4) entre une molécule NAM et une molécule NAG, d'une chaîne de polysaccharides NAM-NAG. La coupure se fait entre le carbone 1 du NAM et le carbone 4 du NAG (Fig.I.9).

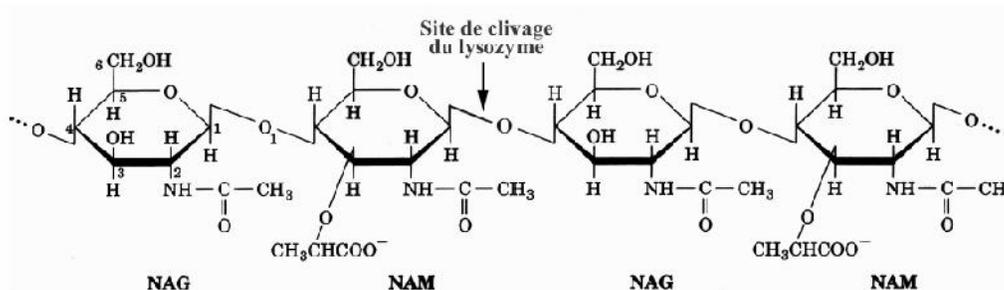


Fig.I.9. Structure du PG et site de clivage du lysozyme [29].

Des lysozymes peuvent aussi couper des polysaccharides naturels (ex : chitine) ou synthétique (ex : poly NAG). En plus d'être la première enzyme dont la structure en 3 dimensions a été élucidée, le lysozyme est la première enzyme dont un mécanisme d'action a été proposé. Le mécanisme proposé par Philips a été largement reconnu comme un paradigme pour le clivage des substrats du lysozyme et ce n'est qu'en 2001 que ce mécanisme pris en exemple dans de nombreux ouvrages scolaires, a été corrigé en montrant l'existence d'un intermédiaire covalent substrat-enzyme.

Il y a 6 sites de liaisons nommés de A à F où se fixent les différents cycles glycosyles du substrat. Le site de coupure se situe entre les sites D et F (Fig.I.10). La (Fig.I.11) montre la séquence réactionnelle menant au clivage du PG par le lysozyme. La molécule de PG se trouve associée avec le site de fixation de l'enzyme (binding site).

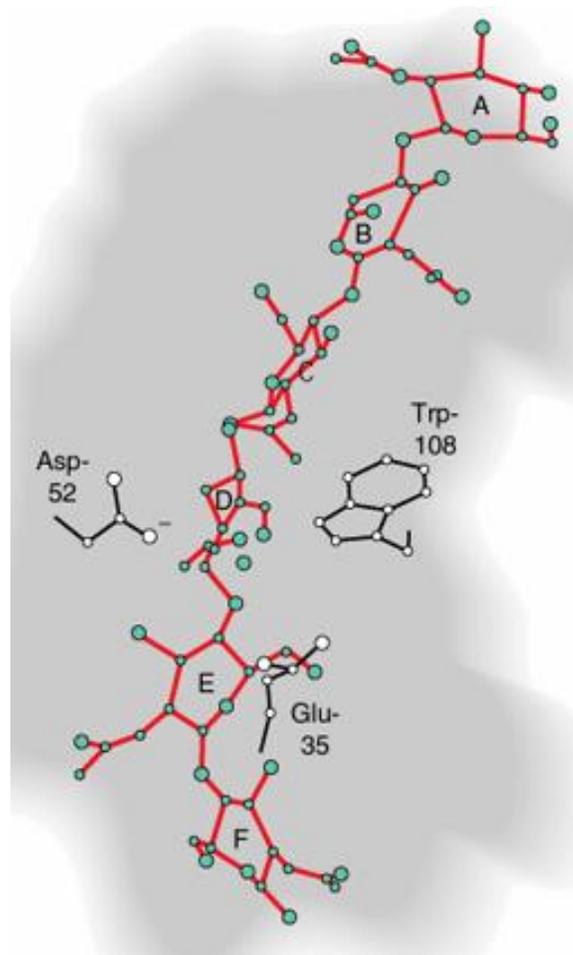


Fig.I.10. Interaction du lysozyme avec le PG [29].

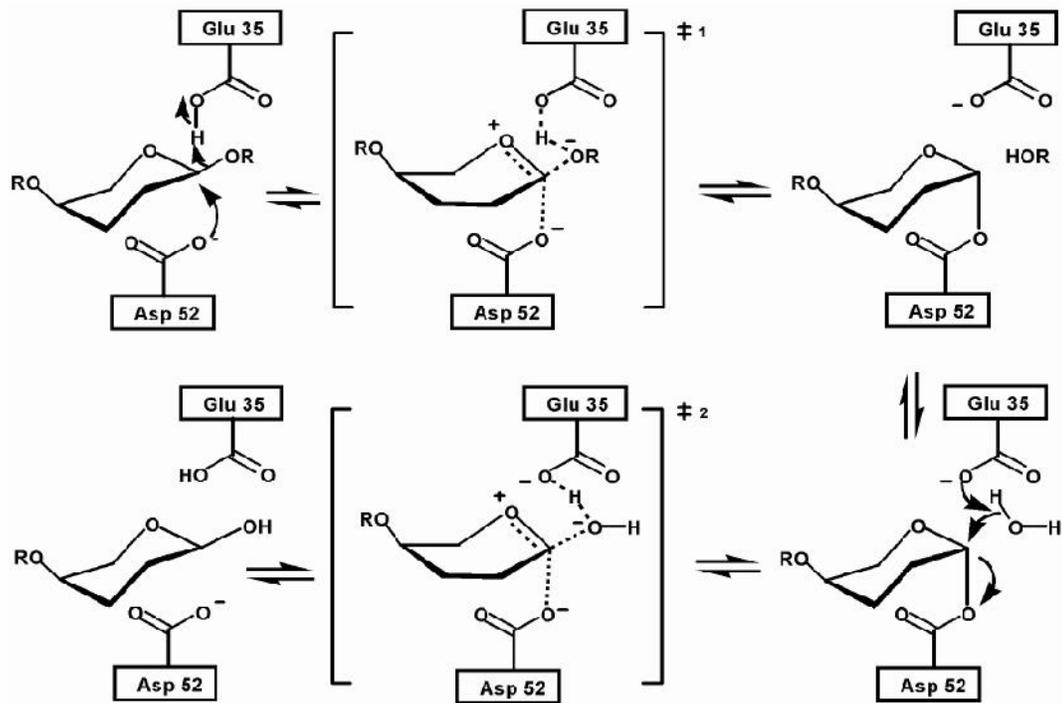


Fig.I.11. Séquence de réaction de glycosyle hydrolase permettant une rétention de configuration anomérique (ex : lysozyme) [29].

Un proton du résidu Glu 35 vient attaquer l'oxygène glycosidique menant au clivage de la liaison C1-O. L'ion oxocarbenium formé aboutit immédiatement à une liaison ester covalente avec une seconde chaîne carboxylate (l'Asp 52). La liaison ester est ensuite hydrolysée par une molécule d'eau. De par des effets d'encombrements stériques, l'attaque nucléophile peut uniquement se produire du côté β du centre anomérique, il en résulte une rétention de configuration anomérique (Fig.I.11).

Les lysozymes de divers organismes ne diffèrent pas uniquement par leur structure mais aussi par leurs mécanismes d'action. Tandis que les lysozymes de type **c** (dont le HEWL) conservent la configuration anomérique, les lysozymes de type **g** et les lysozymes phagiques hydrolysent le substrat en inversant la configuration anomérique. La liaison au substrat et l'activation des enzymes inversant la configuration est très similaire à celles gardant la conformation (Fig.I.12).

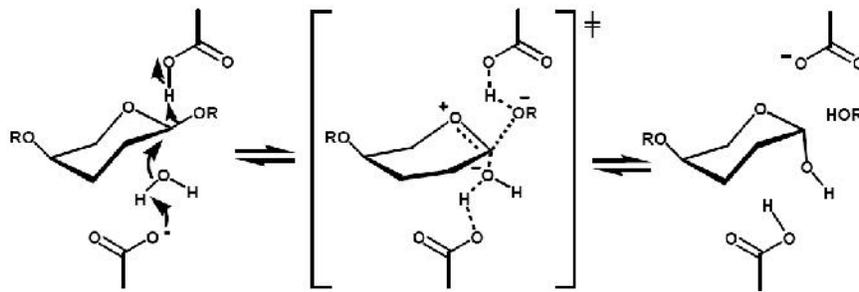


Fig.I.12. Séquence de réaction de glycosyle hydrolase inversant la configuration anomérique [29].

Toutefois, le mécanisme réactionnel est très différent et n'implique pas d'intermédiaire covalent. La liaison glycosidique est clivée par un proton de l'acide carboxylique (Glu 73 pour le GEWL (Goose Egg White Lysozyme) et Glu 11 pour T4L). Une molécule d'eau à proximité du carbone anomérique est activée par une liaison hydrogène au groupement carboxyle (Asp 20 pour T4L) qui sert de base catalytique. L'eau attaque le carbone anomérique du côté α par un simple mécanisme de déplacement résultant à une inversion de configuration [29].

I.3.7. Domaine d'application :

Le lysozyme étant largement reconnu pour ses propriétés antibactériennes et antifongiques, il a une grande variété d'utilisations à la fois dans des applications biochimiques et pharmaceutiques. En biologie moléculaire, le lysozyme est souvent utilisé dans la procédure de lyse alcaline pour extraire et isoler l'ADN plasmidique.

Il est largement utilisé dans le domaine pharmaceutique pour détruire les bactéries à Gram positif, et peut être utilisé pour soutenir les défenses immunitaires déjà existantes pour lutter contre les infections bactériennes « antibiotique endogène ». Cette enzyme est particulièrement importante pour prévenir les maladies bactériennes chez les nourrissons.

En raison de ses propriétés antibactériennes, le lysozyme peut également être utilisé comme conservateur naturel dans l'industrie alimentaire pour aider à prévenir la détérioration des aliments

(en fromagerie pour limiter la prolifération des bactéries butyriques dans les fromages, dans la conservation de la viande, du poisson des fruits et légumes frais [42]).

I.3.8. Méthodes d'extraction de lysozyme de blanc d'œuf de poule :

I.3.8.1. Système biphasé aqueux (ATPS) :

Lorsque deux solutions aqueuses de certaines incompatibles substances, telles que le polyéthylène glycol (PEG) et le dextrane ou PEG et sel, sont mélangés au-dessus d'une concentration critique, une séparation de phase liquide-liquide se produit. Le mélange des protéines ajoutées à ce système à deux phases ont tendance à se partitionner inégale entre les phases permettant ainsi l'extraction d'une protéine particulière. Les techniques de séparation sur la base de ce partage sont connues sous le nom de système biphasé aqueux (ATPS). La partition différentielle est entraînée par les interactions de van der Waals, hydrophobe, hydrogène et ioniques entre les biomolécules et la phase environnante.

Par conséquent, la partition peut être influencée par les concentrations et la masse moléculaire du polymère formateur de phase, la concentration du sel formateur de phase, le type et la concentration des sels ajoutés, la température et le pH. Le poids moléculaire, la forme, les sites de liaison spécifiques et l'hydrophobicité de surface des biomolécules affectent également le comportement de partition. En fait, les propriétés de surface, telles que la charge superficielle de les biomolécules sont probablement les facteurs les plus importants affectant les performances de séparation. Les sels ajoutés (Ex : Phosphate, citrate et sulfate de sodium) affectent la répartition des protéines dans l'ATPS en raison de la distribution différentielle des ions de sel dans les deux phases. Les sels ajoutés contiennent des ions avec différents hydrophobies, c'est-à-dire des ions à différentes positions dans le Hofmeister ou série lyotropique, qui peut diriger le comportement de partitionnement des protéines. Les anions ou les cations les plus hydrophobes, conduiront la partition de leurs contre-ions à la phase la plus hydrophobe et les co-ions les moins hydrophobes seront forcés de se répartir vers la phase la plus hydrophile [43].

I.3.8.2. Adsorption :

Certains adsorbants ont été appliqués pour la séparation du lysozyme, comme la couche de poly-dopamine imprimée en lysozyme sur une microsphère de SiO fibreux, nanoparticules

magnétiques modifiées par poly (4-styrènesulfonate de sodium), membranes nano fibreuses de cellulose carbonylée et ainsi de suite. Cependant, sa structure cyclique spéciale et sa grande taille moléculaire conduisent à une capacité d'adsorption plus faible. Heureusement, réticulé au tétrafluorotéréphtalonitrile des polymères poreux de cyclodextrine (P-CDP) ont beaucoup attiré l'attention du public en raison du taux d'extraction rapide et de la capacité d'absorption élevée.

Étant donné que les P-CDP ont une capacité d'absorption élevée et que β -CD pourrait supprimer l'agrégation du lysozyme, les P-CDP ont été choisis comme adsorbant. De plus, l'introduction de groupe carboxyle peut améliorer l'adsorption non spécifique du lysozyme et la déprotonation du carboxyle peut augmenter la charge négative de surface de matériel. On s'attend à ce que la fonctionnalisation carboxyle des P-CDP conversion d'un groupe nitrile en carboxyle par hydrolyse catalysée par une base peut encore amélioré la capacité d'adsorption du lysozyme via adsorption non spécifique et attractions électrostatiques.

Il existe diverses protéines dans le blanc d'œuf, dont principalement l'ovalbumine (54%), conalbumine (12%) et lysozyme (3,4%). À cause de haute teneur en lysozyme, le P-CDP-COO⁻ tel que préparé appliqué à l'extraction du lysozyme du blanc d'œuf de poule. Donc il y a trois protéines principales dans la solution de blanc d'œuf diluée, deux protéines dans le surnageant après extraction, et seulement lysozyme dans la solution éluée. Il est montré que P-CDP-COO⁻ peut adsorber sélectivement le lysozyme du blanc d'œuf et le lysozyme extrait est de haute pureté [44].

I.3.8.3. La chromatographie colorant-ligand

La chromatographie colorant-ligand a une importance dans la purification des protéines, à la fois pour le laboratoire et des séparations à grande échelle, car elle assure une spécificité élevée, pureté et récupération en une seule étape chromatographique. Les réactifs colorants contiennent des groupes polaires et non polaires et peuvent interagissent avec les protéines par voie hydrophobe et forces électrostatiques. Les composés réactifs colorants se lient les protéines de haute affinité, bien que la capacité de liaison et la spécificité varie selon les composés colorants. Dans des études antérieures, Le chitosane est connu comme un adsorbant efficace dans l'adsorption des protéines parce que les groupes aminés ($-\text{NH}_2$) sur les chaînes de chitosane peuvent servent des sites d'interaction électrostatiques. Parmi les colorants-ligand connus, le Bleu-4 et Rouge-120

immobilisés des membranes polyHydroxyethylmethacrylate/ chitosane (pHEMA / chitosane) ont été utilisées pour la séparation et purification du lysozyme à partir d'une solution pure de lysozyme et de blanc d'œuf, respectivement. Les effets de valeur de pH, température, force ionique, isotherme d'adsorption et les paramètres thermodynamiques des systèmes ont été étudiés en utilisant une solution pure de lysozyme dans un système par lots. Finalement, la pureté du lysozyme élue a été déterminée par HPLC [45].

I.4. Conclusion :

On conclure que la doxycycline présente un large spectre d'action sur des bactéries à Gram positif et négatif, des germes intracellulaires et sur *Plasmodium*.

La doxycycline est fortement absorbée (95%) au niveau intestinal, sa distribution tissulaire est large dont le ($V_d=0.7 \text{ L/ Kg}$), elle est éliminée pendant 3 jours dans les fèces et par voie urinaire, donc elle prescrite même dans le cas d'insuffisance rénale.

Elle est indiquée contre les maladies infectieuses (le choléra, fièvre Q, les infections pulmonaires...), aussi pour traiter des problèmes dermatologiques (l'acné et la rosacée). La doxycycline est contre-indiquée en cas d'allergie aux cyclines. Les effets secondaires de la doxycycline sont peu fréquents et conduisent rarement à l'arrêt du traitement

Concernant le lysozyme, il est actif contre les cellules à Gram-positif à cause de la présence d'une forte proportion de peptidoglycane dans leurs parois cellulaires. Les lysozymes de divers organismes diffèrent par leur structure, proportion, aussi par leurs mécanismes d'action.

La stabilité de lysozyme d'œuf de la poule est expliquée par la présence des quatre ponts disulfures dans son structure tridimensionnelle et par son résistance aux facteurs environnementaux : hautes pressions osmotiques et sur une large gamme de pH de température.

On a vu trois méthodes d'extraction de lysozyme: L'ATPS l'adsorption, la chromatographie colorants-ligand. L'ATPS est avantageux en raison du teneur en eau des deux phases, ce qui signifie une biocompatibilité élevée et faible tension interfaciale, taille moléculaire minimisant. La capacité d'adsorption de lysozyme peut être affectée par son structure et taille moléculaire, et par

le choix du polymère adsorbant. La chromatographie colorant-ligand permet la purification et la séparation des protéines, à la fois pour le laboratoire et à grande échelle.



Chapitre II: L'encapsulation



II.1. Introduction :

L'encapsulation a pour but d'augmenter la stabilité, masquer les goûts indésirables et améliorer les propriétés de libération des composés thérapeutiques et permettre l'administration de médicaments spécifiques.

La nature des matériaux et le procédé d'encapsulation permet de spécifier la taille des particules à obtenir, ainsi leurs profile de libération.

II.2. Généralités :

L'encapsulation est un procédé permet l'emprisonnement de principes actifs sous formes solide, liquide ou gazeuse au sein d'un matériau support. Elle résulte donc en la préparation de particules individualisées constituées d'un matériau enrobant contenant un principe actif. La matrice enrobante représente une barrière permettant l'immobilisation, la fonctionnalisation, la structuration et la protection du principe actif ainsi que le contrôle de sa libération.

La première application basée sur la technologie de l'encapsulation a été commercialisée dans le domaine de l'imprimerie. Il s'agit du papier carbone sans carbone aussi appelé « papier autocopiant » permettant la duplication d'un texte ou d'une figure sous l'effet d'une faible pression.

Ce produit contient des microparticules de colorant réalisées par coacervation complexe entre la gélatine et la gomme arabique qui se brisent sous l'effet de la pression d'une tête d'imprimante ou d'un stylo. A la fin des années cinquante la technologie de la microencapsulation fut utilisée dans le domaine pharmaceutique pour les médicaments analgésiques à libération prolongée par exemple, ainsi que pour d'autres applications industrielles telles que les colles. Au cours des années qui suivirent, la microencapsulation devient un domaine de recherche dynamique tant au niveau académique qu'industriel [46].

La microencapsulation regroupe l'ensemble des techniques permettant l'obtention de particules dont la taille est comprise entre $1\mu\text{m}$ et $1000\mu\text{m}$ contenant une substance active solide, liquide ou gazeuse.

II.3. Types de microparticules :

Les microparticules peuvent être classées en deux catégories selon leur microstructure :

- © **Microcapsules** : particules sphériques du type cœur-couronne ; Le cœur étant constitué de la substance active à encapsuler, et la couronne enveloppe solide formée par l'agent encapsulant. Chaque microcapsule constitue un système réservoir proprement dit.
- © **Microsphères** : sont constituées d'un réseau polymère dans lequel est dispersée la substance active à l'état moléculaire ou particulaire. Cette structure est dite « système matriciel ». [47]

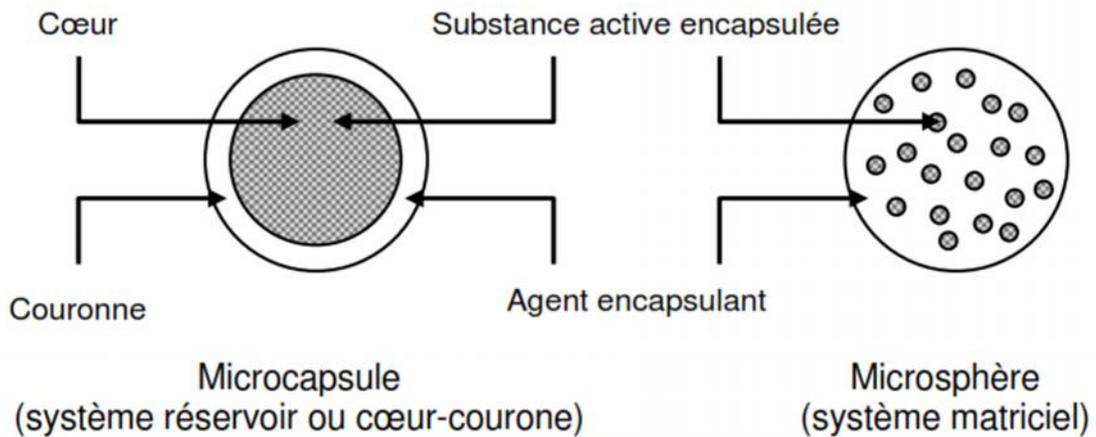


Fig.II.1. Classes des microparticules et leur microstructure [47].

II.4. Matériaux d'encapsulation :

La membrane protectrice des microparticules peut être formée d'une monocouche ou d'une multicouche quelle que soit leur microstructure. Le choix d'une membrane est effectué sur

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

Les matériaux utilisés pour obtenir ces structures sont nombreux et variés. Nous pouvons les classer dans le tableau suivant [48]:

Tab.II.1. Principaux matériaux d'encapsulation [49]

Types de matériaux d'encapsulation	Exemples de matériaux d'encapsulation	Procédé utilisables	Exemples de domaine d'application
polymères d'origine naturelle	Gélatine	Coacervation simple et complexe	Arome, parfum, pharmacie, papeterie
	Alginate de sodium	Coacervation complexe	Biomédical, Arome cosmétique, parfum, pharmacie (libération entérique)
	Chitosane	Coacervation complexe Nébulisation Lit d'air fluidisé	pharmacie (libération gastrique)
	Amidon	Nébulisation	Alimentaire
Polymères cellulosiques	Ethylcellulose	Coacervation simple Nébulisation Lit d'air fluidisé Evaporation du solvant	Pharmacie Biomédical
	Hydroxypropylcellulose		
	Hydroxypropyl méthylcellulose		
	Phtalate d'hydroxypropyl méthylcellulose		
Polymères de synthèse	copolymères acryliques et méthacryliques	Nébulisation Lit d'air fluidisé Evaporation du solvant	Pharmacie
	Polyoléfines	Evaporation du solvant	Chimie, biomédical, phytosanitaire
	copolymères (acrylo-) vinyliques		
	Polycaprolactone	Nébulisation	Pharmacie, vétérinaire
polymères d'acides lactiques et glycoliques	Lit d'air fluidisé Coacervation simple		

		Evaporation du solvant	
Les lipides et cires minérales	corps gras solides	Hot-melt Lit d'air fluidisé	cosmétique, chimie, pharmacie, textile, vétérinaire, alimentaire
	Glycérides		
	cires (d'abeille, de carnauba...)		
	cires minérales		

II.5. Composés encapsulés :

Plusieurs grandeurs sont employées pour caractériser le procédé d'encapsulation et par suite la particule obtenue, on citera :

- Le rendement d'encapsulation

$$\text{rendement d'encapsulation} = \frac{m(\text{méc o})}{m(\text{p a i l})} \times 100$$

- La teneur en principe actif ou taux d'encapsulation

$$\text{teneur en principe actif} = \text{taux d'encapsulation} = \frac{m(\text{a e})}{m(\text{p})} \times 100$$

- L'efficacité d'encapsulation :

$$\text{efficacité d'encapsulation} = \frac{m(\text{d'a e})}{m(\text{d'a i l})} \times 100$$

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 microsphères sont plus faibles, de l'ordre de 20 à 35 % au maximum [49].

II.6. Objectifs :

Le recours à l'encapsulation est effectué pour plusieurs raisons. En premier lieu, il s'agit de protéger les produits de l'environnement et en deuxième lieu de maintenir leurs caractéristiques et propriétés : antioxydantes, odorantes, colorantes, pharmacologique, etc. Parmi ces objectifs recherchés :

- Préserver un principe actif ou une substance du milieu extérieur lors de la fabrication d'un produit. La substance encapsulée peut alors sans dégradation subir divers procédés de fabrication comme des cuissons, des extrusions, des stérilisations.
- Transformer un liquide en solide. En effet, lors de l'encapsulation d'un produit liquide. Celui-ci est transformé en poudre de granulométrie plus ou moins fine ; on obtient alors un pseudo-solide.
- Faire varier la masse volumique d'un liquide en l'encapsulant. Ce faisant, on peut obtenir qu'un produit dense flotte ou bien qu'un produit léger coule.
- Diminuer la volatilité d'un produit possédant une forte tension de vapeur. Ceci est valable par exemple pour les arômes dans les préparations culinaires.
- Obtenir une diffusion contrôlée d'un produit actif. Ceci est surtout valable dans les formes pharmaceutiques, afin d'obtenir des médicaments à effet retard.
- Séparer deux produits incompatibles devant se trouver dans un même mélange. De cette façon, on peut faire coexister deux produits réactifs [50].

II.7. Avantages et inconvénients d'encapsulation :

II.7.1. Avantages :

-) De nombreux Principes actifs, tant hydrophiles que lipophiles peuvent être encapsulés dans des microparticules polymériques, et ce, avec un bon rendement d'encapsulation.
-) L'augmentation de la stabilité des ingrédients sensibles.
-) la conversion des liquides en poudres fluides.
-) le masquage d'odeur, du goût ou d'activité des matériaux encapsulés.
-) la diminution de la vitesse d'évaporation de la matière active volatile;
-) la formulation des principes actifs utilisés en très petites quantités;
-) la libération contrôlée ou ciblée de composants actifs.
-) Modifier et maîtriser le profil de libération d'une matière active pour obtenir, par exemple, un effet prolongé ou déclenché

II.7.2. Inconvénients :

Toutefois les microparticules ont également quelques inconvénients :

-) La plupart des techniques de production impliquent l'utilisation de solvants organiques. Des résidus de ces solvants peuvent donc se retrouver dans les microparticules.
-) La dégradation de certains polymères comme les PLGA crée un micro-pH acide qui peut endommager certains principes actifs comme les peptides et les protéines.
-) Le profil toxicologique de bon nombre de polymères est incertain [51].

II.8. Procédés de microencapsulation :

Les microparticules peuvent être obtenues de plusieurs façons, suivant la taille désirée et les propriétés physico-chimiques du principe actif encapsulé. On distinguera trois grandes familles de procédés d'obtention (Tableau II.2) :

- procédés physico-chimiques.
- procédés chimiques.
- procédés mécaniques [52]

Tab.II.2. Classification des procédés de microencapsulation [52].

Procédés	Techniques d'encapsulation	Quelques exemples de polymères	La taille de microparticules obtenues	Types de microparticules obtenues
Physico-chimiques	Coacervation simple	Gélatine ; méthylcellulose ; pectine ; alcool polyvinylique ; acétophtalate de sodium	2 – 1200 μm	Microcapsule
	Coacervation complexe	Gélatine/gomme arabique ; gélatine/acide polyacrylique ; gélatine/alginat de sodium...	2 – 1200 μm	et Microsphères
	Hot-melt ou gélification thermique	Cire de carnauba	30 – 300 μm	Microsphères

	Evaporation de solvant	Poly(acide lactique) : poly(acide glycolique) ; polystyrène ; poly(méthacrylate de méthyle) ; éthylcellulose : copolymère (acide lactique/acide glycolique)...	0,5 – 200 µm	Microsphères
Chimiques	Polymérisation interfaciale	Polyamides : polyesters ; polyuréthanes ; polyurée...	2 – 2000 µm	Microcapsules
	Polymérisation in situ (en milieu dispersé)	Dérivés acryliques : poly(méthacrylate de méthyle) : dérivés du polystyrène...	2 – 2000 µm	Microsphères
Mécaniques	Lit d'air fluidisé	Alginates ; dérivés cellulosiques : dérivés méthacryliques ; sucres (application dans l'industrie alimentaire)	35 – 5000µm	Microcapsules
	Nébulisation (spray-drying)	Colloïdes hydrophiles : gomme arabique : dérivés cellulosiques ; gélatine...	200 – 800µm	Microsphères

II.8.1. Procédés physico-chimiques :

II.8.1.1. Techniques de coacervation :

Les techniques de coacervation s'appliquent à des solutions colloïdales de substances macromoléculaires : le terme coacervation décrivant un changement de solubilité des solutions de colloïdes. Le procédé d'encapsulation par coacervation est décrit dans la Figure I. 2. La première étape consiste à disperser le produit à encapsuler dans une solution colloïdale (étape 1). Puis, on modifie la solubilité du colloïde (étape 2). Il existe différentes façons de modifier la solubilité des substances macromoléculaires comme :

- la variation de pH.
- la variation de concentration.
- la variation de la force ionique (activité).
- la variation de température.
- l'addition d'un non-solvant.
- l'addition d'un polymère incompatible.

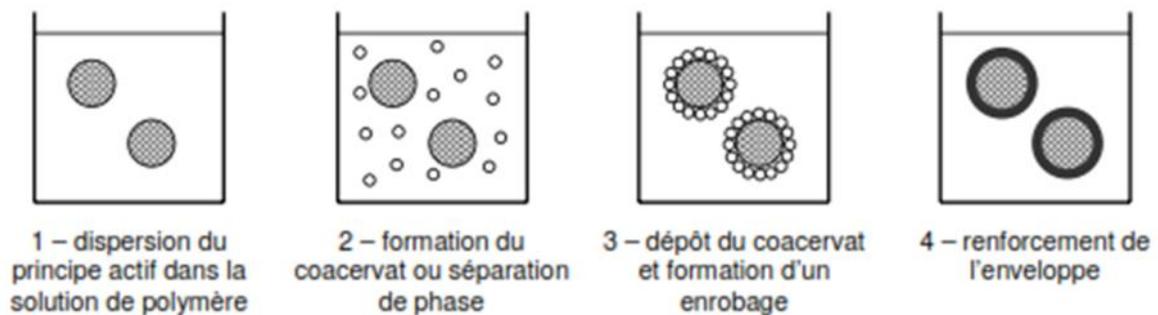


Fig.II.2. Principe de l'encapsulation par coacervation [52].

Les substances macromoléculaires devenant moins solubles se regroupent pour former des gouttelettes appelées coacervats.

Tab.II.3. Polymères, solvants, agents de coacervation utilisés dans les méthodes d'encapsulation par coacervation [52].

Polymère	Solvant	Agent de coacervation
----------	---------	-----------------------

Gélatine	Eau	Ethanol, Sels ionique de Na ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺
Méthylcellulose	Eau	Acétone, électrolytes
Pectine	Eau	Isopropanol
Alcool polyvinylique (PVA)	Eau	Propanol
Acétophtalate de cellulose	Eau	Di-sodium hydrogénophosphate
Ethylcellulose	Dichlorométhane	Addition d'un non solvant (n-hexane)
Carboxyméthylcellulose et poly(d,1-acide lactique)	Acétate d'éthyle	Addition d'un non solvant, éther éthylique
Nitrate de cellulose	Ether	Coacervation interfaciale induite par la nature aqueuse du produit encapsule
Polyéthylène-co-acétate de vinyle	Toluène chaud	Addition d'un polymère incompatible (polybutadiène, polyméthylsiloxane) et abaissement de la température

II.8.1.2. Technique de gélification thermique ou Hot-melt :

Le procédé de gélification thermique d'émulsion est réalisé à une température supérieure à la température de fusion du matériau enrobant. Le principe actif est dissout ou dispersé dans ce matériau fondu. Cette phase est ensuite émulsionnée au sein d'une phase dispersante préalablement chauffée à la même température. Cette méthode est applicable à l'encapsulation de principes actifs hydrophiles et lipophiles, en prenant en considération que le principe actif ne doit présenter aucune affinité avec la phase dispersante. A cet effet, pour les substances lipophiles l'eau distillée est généralement choisie comme phase dispersante, tandis que pour les substances hydrophiles les huiles de silicone sont utilisées. La solidification des globules dispersés est obtenue en refroidissant brutalement le milieu.

Les microsphères obtenues suivant ce procédé ont une taille de 30µm à 300µm en général. Elles ont une teneur en principe actif de l'ordre de 20%.

L'inconvénient réside en la formation de formes cristallines non souhaitées et l'altération physique des microsphères au cours du refroidissement. Cette technique peut être utilisée avec des matières actives à encapsuler très fragiles comme par exemple les levures en choisissant des matrices enrobantes caractérisées par un point de fusion peu élevé (environ 35°C) [49].

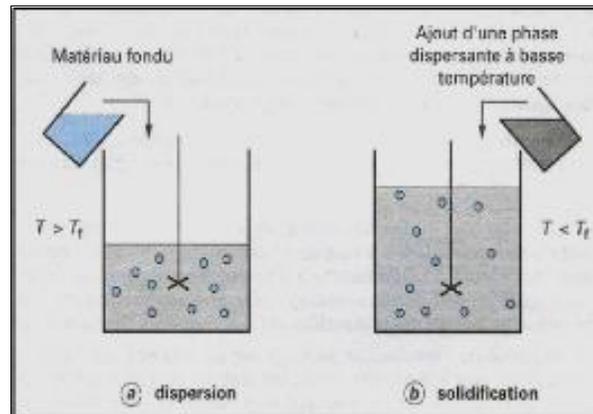


Fig.II.3. Schéma de principe du procédé d'encapsulation par gélification Thermique [49].

II.8.1.3. Technique par évaporation de solvant :

Cette technique permet d'encapsuler une grande variété de principes actifs solides ou liquides, hydrophiles ou lipophiles. Suivant la nature du principe actif, on obtient des systèmes réservoirs ou matriciels. Le principe général de la technique d'évaporation de solvant est le suivant : il y a toujours un solvant X du polymère constituant la phase à disperser et un solvant Y servant de phase continue. On choisit toujours un couple de solvants X et Y possédant une faible miscibilité réciproque (quelques %). Dans un premier temps, le solvant X de la phase dispersée diffuse vers la phase continue (solvant Y). Dans un deuxième temps, il y a évaporation du solvant X à l'interface entre le milieu en suspension et le milieu atmosphérique. Il faut donc choisir le solvant X en fonction de sa miscibilité avec le solvant Y et de sa volatilité. Il est préférable qu'il ait un point d'ébullitions assez basses et une tension de vapeur élevée.

On peut accélérer l'évaporation du solvant X en maintenant une pression réduite à l'interface (milieu en suspension / milieu atmosphérique) ou en renouvelant la partie gaz de cette interface.

Le dichlorométhane est de loin le solvant X le plus utilisé. Il est très volatil, ce qui favorise son évaporation et de plus il solubilise un nombre important de polymères. Son plus grand inconvénient est sa toxicité, d'autant que des quantités notables de dichlorométhane peuvent rester dans la microcapsule après séchage.

Les schémas de principe des deux cas de procédés les plus fréquemment rencontrés sont détaillés sur les Figures II.4 et II.5.

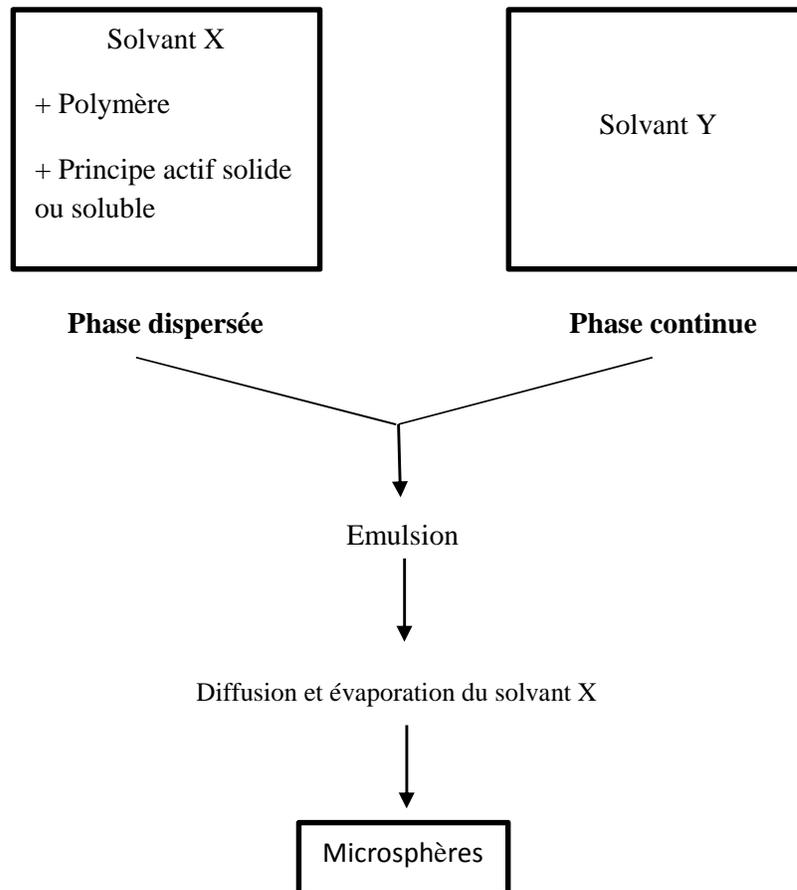


Fig.II.4. Schéma du procédé de microencapsulation par évaporation de solvant pour principe actif solide ou soluble dans la solution de polymère. [52]

Le premier cas concerne les principes actifs solides ou les principes actifs solubles dans la solution de polymère. Ainsi on a dans la solution de polymère soit la formation d'une dispersion du principe actif solide, soit la solubilisation du principe actif. La dispersion (principe actif solide solution de polymère) ou la solution (principe actif 4. polymère) est ensuite dispersée dans un

solvant non miscible qui constitue la phase continue d'une émulsion (Figure I. 3). Une fois le solvant X du polymère évaporé (après sa diffusion à travers la phase continue), on obtient un système matriciel. Le principe actif étant inclus dans une matrice dense. Généralement, il reste des traces de solvant du polymère dans les parois des microcapsules [52].

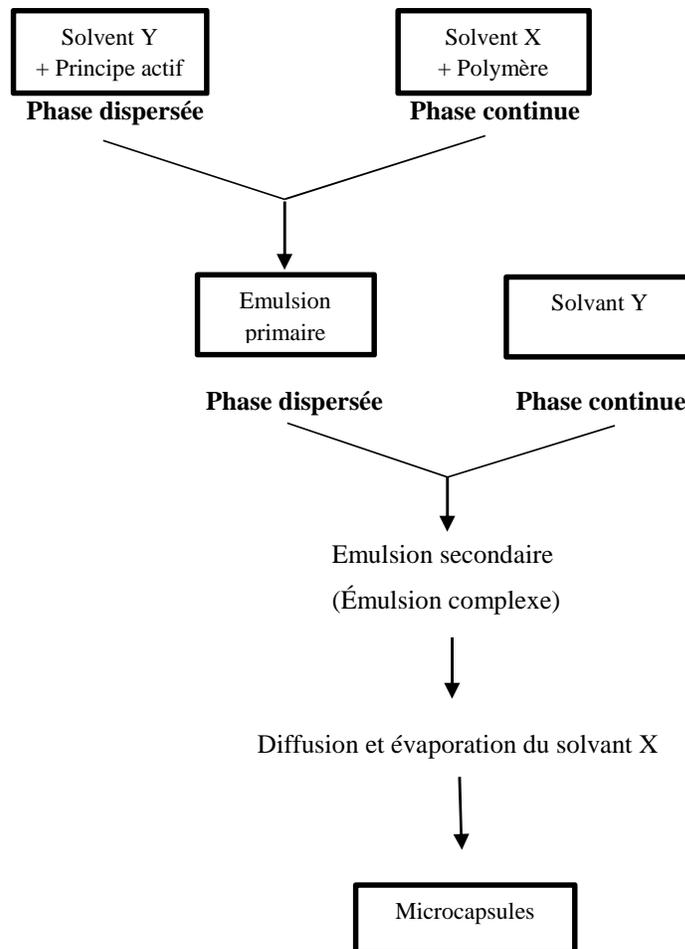


Fig.II.5. Schéma du procédé de microencapsulation par évaporation de solvant pour principe actif non soluble dans la solution de polymère. [52]

Le second cas concerne les principes actifs liquides non miscibles dans le solvant du polymère. Le schéma de principe est présenté dans la Figure L 4. Il y a dans un premier temps formation d'une émulsion primaire. Le principe actif est dispersé dans la solution du polymère. Ensuite l'ensemble de cette émulsion primaire constitue la phase à disperser de l'émulsion

secondaire. On prépare l'émulsion secondaire en se servant d'une phase continue de même nature que celle du produit actif. Cette émulsion est dite complexe, par exemple eau dans huile dans eau (E/H/E) si le principe actif est hydrophile. Après diffusion et évaporation du solvant du polymère. On obtient dans ce cas un système réservoir. Lors de la formation de l'émulsion secondaire. Si la membrane liquide de solution de polymère n'est pas continue et étanche. Il y a une fuite du principe actif qui est soluble dans la phase continue. D'autre part, la membrane formée étant poreuse, il ne faut pas que l'opération dure trop longtemps car le rendement d'encapsulation peut diminuer si la cinétique de relargage du produit est suffisamment rapide. [52]

Tab.II.4. Exemples de principes actifs hydrophiles et hydrophobes encapsulés par la méthode de microencapsulation par évaporation de solvant [52].

Nature du principe actif	Principe actif encapsulé	Méthode d'encapsulation	Polymère de la matrice Enrobante
Principe actif Hydrophile	Albumine de sérum bovin	huile/huile	mélange de PLA et PEG
		huile/eau	PCL, PLG
		eau/huile/eau	PLGA PCL PCL et PLGA
	Insuline	huile/huile	PLGA PLGA
		eau/huile/eau	PLGA
	Lidocaine	huile/huile	Eudragit S 100
huile/eau		PLA et PDLA PLA	
huile/eau		PLGA EC PLA, PCL, P(LA-bCL) EC	

Principe actif Hydrophobe	indométhacine	huile/eau	Eudragit RL, Eudragit RS, Ec, polystyrène, PMMA PLGA
		huile/eau et eau/huile	Eudragit RL, Eudragit RS

II.8.2. Procédés chimiques

II.8.2.1 Encapsulation par polymérisation interfaciale:

Cette technique qui est la plus récente, combine une émulsion eau dans huile (E/H) ou huile dans eau (H/E) et une réaction chimique entre deux réactifs à l'interface de la phase continue et de la phase dispersée. La phase à disperser contient un solvant, un principe actif et le monomère A. Elle peut être soit aqueuse, soit organique. La phase continue est constituée d'un solvant et d'un monomère B. Au départ l'émulsion se fait en l'absence du monomère B. Ce dernier n'est introduit qu'à partir du moment où l'émulsion est stabilisée. La réaction de polymérisation peut ensuite débiter.

Dans les conditions idéales où chacun des monomères est présent dans une seule des deux phases (coefficients de partages égaux à 0 ou 1) la réaction de polymérisation démarre nécessairement à l'interface et forme la première pellicule protectrice des microparticules appelée membrane primaire. Ensuite par diffusion des monomères à travers la première pellicule. La réaction de polymérisation continue. En pratique, il peut exister un coefficient de partage des monomères dans chacune des deux phases.

Des oligomères peuvent donc se former à l'intérieur des gouttelettes. Deux situations extrêmes peuvent se produire, ce qui explique l'obtention possible de microsphères ou microcapsules (Figure II.6) :

- les premières oligomères formées sont très solubles dans les gouttelettes : par conséquent, ils croissent dans les gouttes jusqu'à former une matrice polymère solide formant ainsi des microsphères.
- les oligomères initialement formés sont insolubles dans les gouttelettes de substance à encapsuler : lorsqu'ils grandissent, ils précipitent à l'interface de la particule dispersée et forment la membrane protectrice autour des gouttelettes conduisant ainsi à des microcapsules. [52]

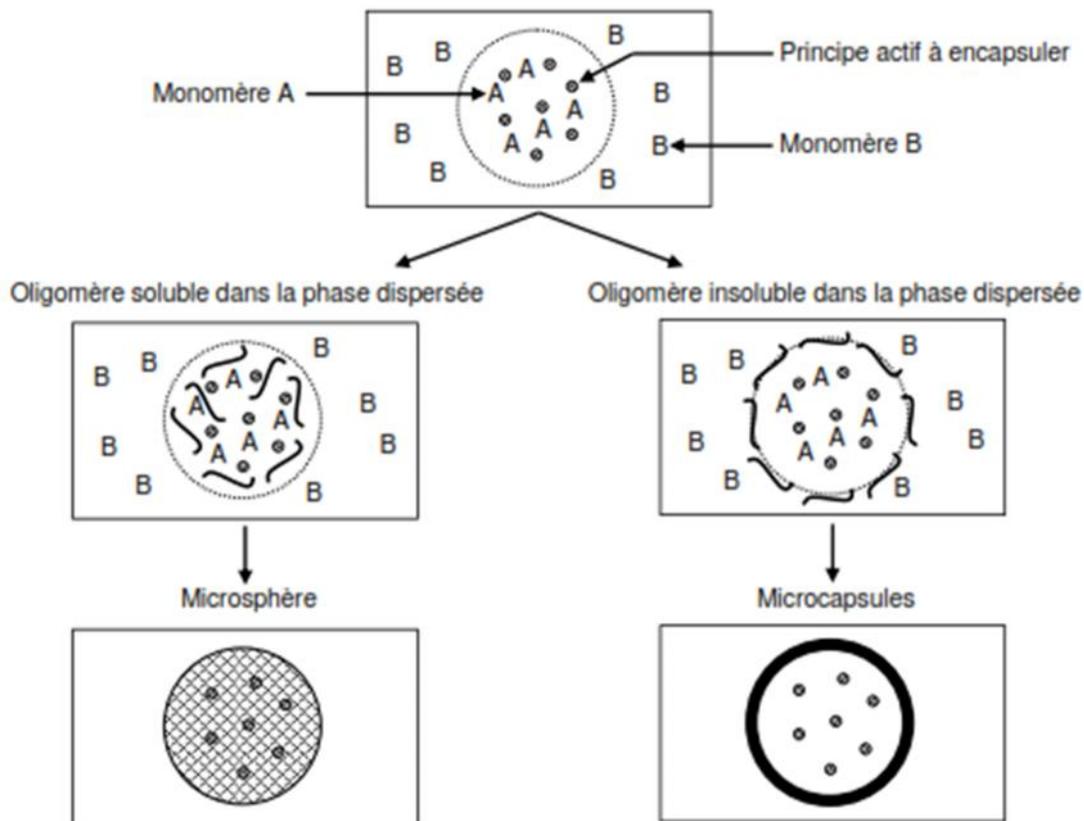


Fig.II.6. Mécanisme de formation des microparticules par polymérisation interfaciale. [52]

II.8.2.2. Microencapsulation par polymérisation in situ :

Un monomère, le plus souvent vinylique ou acrylique tel le styrène ou le méthacrylate de méthyle, est solubilisé dans la substance à encapsuler en présence d'un amorceur organosoluble. Cette solution est émulsifiée dans l'eau à l'aide d'un tensioactif approprié. La polymérisation étant amorcée le polymère résultant, qui doit être incompatible avec l'eau et plus hydrophile que la

substance à encapsuler, peut alors se déposer à l'interface phase organique-eau pour former la couronne de la particule. Pour la consolider, un réticulant tel le divinylbenzène peut être utilisé avec le styrène comme co-monomère. Il faut noter que par cette technique, on obtient très souvent la formation de microsphères. Des systèmes particuliers, le plus souvent classés parmi les procédés d'encapsulation in situ sont les méthodes d'encapsulation basées sur l'utilisation de prépolymères solubles dans l'eau. Ces systèmes font intervenir des précondensats de formaldéhyde et d'urée ou de formaldéhyde et de mélamine. La précipitation de ces précondensats solubles dans l'eau est induite par chauffage en milieu acide [51].

II.8.3. Procédés mécaniques :

Les procédés mécaniques, plutôt répandus dans l'industrie agro-alimentaire, s'apparentent souvent aux techniques d'enrobage. Les deux principales techniques sont celle par lit d'air fluidisé et celle par nébulisation (spray-drying).

II.8.3.1. Lit d'air fluidisé

Dans cette technique, des particules solides sont dispersées dans une solution organique contenant un polymère solubilisé. Sous l'action d'un fort courant d'air ascendant, ces particules sont mises en suspension dans l'air ce qui a pour effet d'évaporer le solvant et d'enrober les particules de polymère. Il existe différents types d'enduit à lit fluidisé comprennent le jet d'air supérieur (a), le jet inférieur (b) et le jet tangentiel (c) [51].

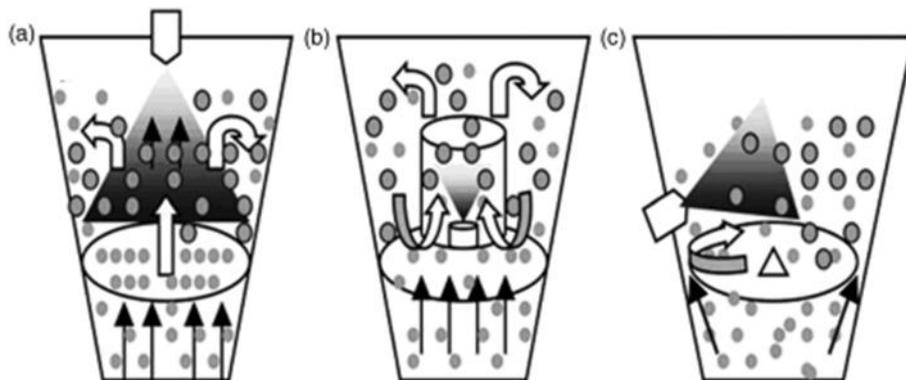


Fig.II.7. Schématisation des types d'enduit à lit fluidisé. [51]

II.8.3.2. Nébulisation (spray-drying) :

La seconde technique. Celle par nébulisation, utilise une solution aqueuse de polymère contenant un principe actif. Cette phase est injectée par une buse dans un courant d'air chaud. Les fines gouttelettes ainsi formées s'évaporent très rapidement dans l'air chaud, donnant une particule solide.

Nous allons développer plus particulièrement les procédés des deux premières grandes familles, qui présentent l'avantage de ne pas nécessiter d'équipements importants et particuliers dont nous ne disposons pas à l'échelle du laboratoire. [51]

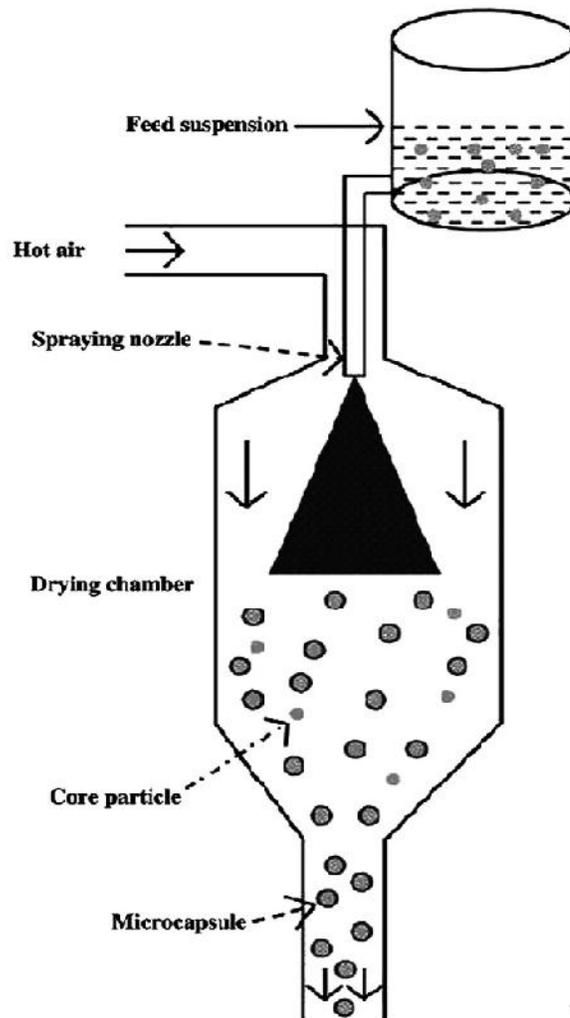


Fig.II.8. Principe de formation de microparticules par la méthode de nébulisation (spray-drying). [51]

II.9. Libération contrôlée :

II.9.1. Généralité :

Le terme de la libération contrôlée englobe la délivrance des composés sous l'effet de certains facteurs comme le pH, les enzymes, la lumière, la température, le magnétique, les ultrasons... Elle présente un profil qui correspond à une cinétique dite d'ordre zéro, indépendante du temps.

De plus, le taux de libération dépend des certains paramètres incluant le type de polymère ; la solubilité et la dose de médicament ; le rapport polymère / médicament ; la taille des particules du médicament et du polymère ; et la structure et porosité de la forme de la matrice.

La libération du produit encapsulé peut être obtenue de plusieurs façons, on distingue deux grands types de systèmes :

-) **Systèmes à libération provoquée ou déclenchée** : le contenu de la capsule est obtenu après la rupture de la paroi sous l'effet d'une contrainte mécanique (pression osmotique) ou thermique.
-) **Systèmes à libération contrôlée et prolongée** : la libération du produit actif peut être contrôlée soit par diffusion à travers la paroi (l'épaisseur et la porosité de la membrane influencent le temps de relargage). Soit par la dégradation enzymatique ou chimique de la couche polymère qui devient poreuse et permet la diffusion à travers la paroi.

II.9.2. Mécanismes de libération

Sur la base des caractéristiques et des propriétés physiques et chimiques du polymère, le mécanisme de libération du médicament de la matrice polymère peut être classé en trois systèmes principaux [3] :

II.9.2.1. Par diffusion :

Le contrôle de la libération par diffusion est le mécanisme le plus répandu parmi les systèmes à libération contrôlée. Le principe actif migre de l'intérieur vers la surface de la forme galénique puis dans le fluide environnant de l'hôte. En général, ces systèmes s'appliquent à des molécules de petite taille et ne sont pas biodégradables.

II.9.2.1.1. Système réservoir (à membrane) :

Le principe actif compacté est situé au centre du système (noyau), entouré d'une membrane polymérique perméable. La diffusion du principe actif s'effectue à travers les chaînes macromoléculaires du polymère quand la membrane est homogène et non poreuse (majorité des cas), ou à travers les pores quand elle est microporeuse. L'épaisseur et la perméabilité de la membrane contrôlent en partie la vitesse de diffusion du principe actif. Ces systèmes ont le grand avantage d'approcher une cinétique de libération d'ordre zéro (transport de type cas II), où la vitesse de diffusion est constante. [53]

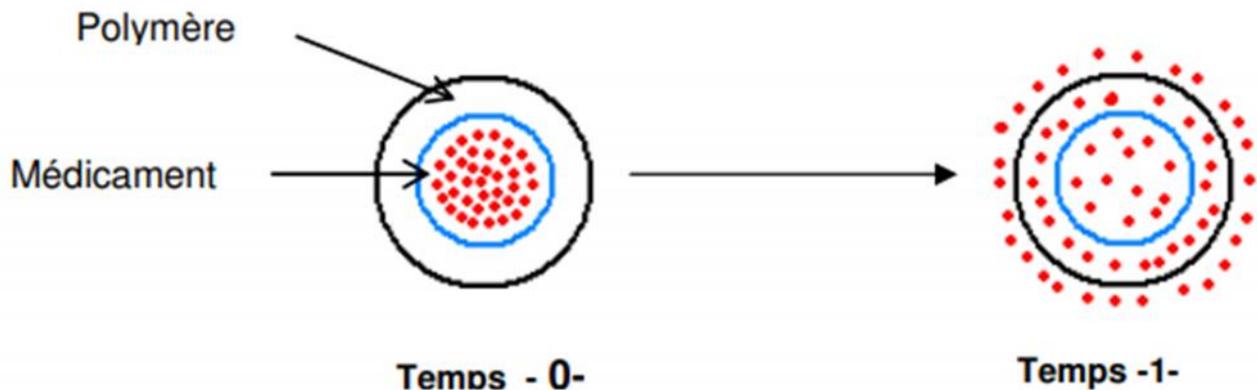


Fig.II.9. Libération contrôlée d'un principe actif par diffusion (système réservoir). [53]

II.9.2.1.2. Système matriciel (monolithique) :

Comme pour le système réservoir, la diffusion du principe actif à travers le polymère est le facteur limitant. Cette distribution uniforme du principe actif par rapport au polymère est simple de conception, rendant ainsi ce système peu onéreux à fabriquer. Par contre, la cinétique de libération obtenue n'est pas d'ordre zéro. Elle est caractéristique d'un mécanisme de dissolution – diffusion où la vitesse de libération diminue avec le temps. Plus la concentration initiale de principe actif est élevée, plus sa libération est grande. En fait, la quantité de principe actif libérée est proportionnelle à la racine carré du temps, qui correspond à un transport de type Fickien (cas I). La diminution de la vitesse de libération du principe actif en fonction du temps s'explique de la façon suivante. Au début, c'est le principe actif proche de la surface qui est libéré avec une courte

-) Polymères non hydrosolubles solubilisés par clivage des chaînes macromoléculaires en petites molécules hydrosolubles (exemples : PLGA, PCL, POE).

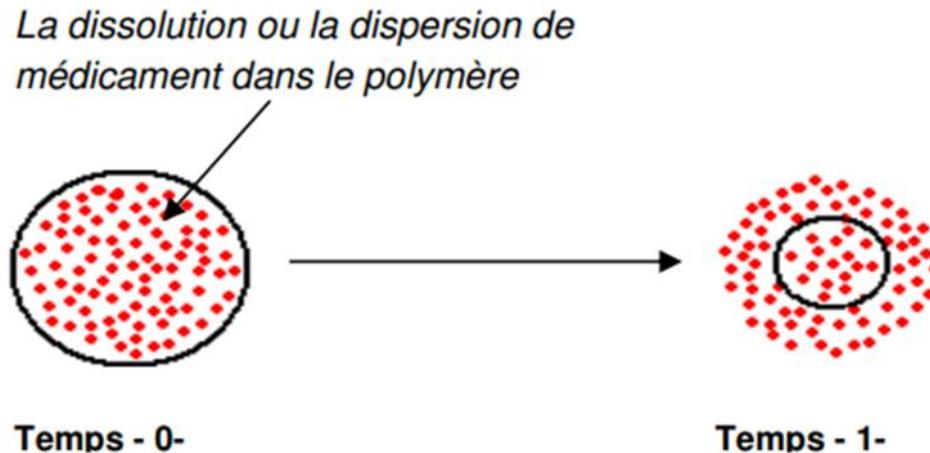


Fig.II.11. Libération contrôlée d'un principe actif avec le système biodégradable [53].

II.9.2.3. Par éclatement :

Le principe actif est dissous ou dispersé au sein de la matrice polymère sans être capable d'en sortir. Avec l'entrée du solvant, le polymère solide à l'état vitreux, gonfle. La température de transition vitreuse diminuant, le polymère passe à l'état caoutchouteux pour ressembler à un gel. Il se crée ainsi un front de séparation gel – solide qui progresse vers le centre du système (Figure 10-a). Avec la relaxation macromoléculaire associée à la transition à l'état caoutchouteux, le principe actif est alors capable de diffuser vers l'extérieur.

Le système à gonflement est particulièrement intéressant pour la libération de protéines parce qu'il est le seul type à laisser diffuser ces molécules de masse molaire élevée, grâce aux canaux de fluide présents dans la matrice à l'état de gel. Le système à gonflement typique est l'hydrogel, polymère très hydrophile, qui absorbe le solvant en grande quantité.

La vitesse de libération du principe actif est proportionnelle à celle de la pénétration du solvant dans la matrice polymère. À la différence des systèmes de libération contrôlée par diffusion, le système à gonflement a l'avantage de donner un type de libération indépendant des propriétés du

principe actif. Il n'est pas nécessaire ainsi, d'établir une nouvelle formulation pour un principe actif ayant des propriétés différentes [53].

II.9.3. Cinétique de libération :

Dans les cas où la libération du principe actif se fait par diffusion à travers la membrane, la perméabilité de cette dernière est une propriété très importante dans la mesure où sa structure gouverne par la suite la cinétique de libération de la substance encapsulée. Or la perméabilité de la membrane dépend de plusieurs paramètres qui sont :

-) L'épaisseur de la membrane.
-) La morphologie de la surface de la membrane.
-) La densité de réticulation la membrane.
-) Le taux de cristallinité du polymère.
-) La structure chimique du polymère

La perméabilité de la membrane est reliée à son épaisseur dans la mesure où une augmentation de cette dernière aura tendance à diminuer la vitesse de relargage du principe actif. La densité de réticulation de la membrane, qui peut être ajustée par l'emploi d'agents réticulant, permet d'agir sur la taille des pores, qui joue également un rôle prépondérant sur la cinétique de libération du principe actif. Le taux de cristallinité du polymère, dépendant lui-même de la vitesse de la réaction de polycondensation, influe également sur la vitesse de libération de la substance encapsulée dans le sens d'une diminution quand le taux de cristallinité augmente.

La plupart de ces paramètres sont liés à la nature des monomères employés. En effet, l'épaisseur de la membrane dépend, outre de la quantité de monomères utilisée, de la structure chimique de ces derniers. Ainsi, l'emploi de monomères trifonctionnels a pour conséquence l'obtention de membranes réticulées et donc plus épaisses que lorsque des monomères bifonctionnels sont utilisés. D'autre part l'emploi de monomères bifonctionnels permet d'obtenir un polymère plus cristallin qu'avec des monomères trifonctionnels.

La résistance mécanique des capsules dépend largement de la taille de ces dernières, ayant tendance à diminuer quand la taille augmente. Elle peut être ajustée via l'emploi d'un agent

réticulant dans des proportions adéquates. Par ailleurs la résistance mécanique augmente avec l'épaisseur de la membrane, ce qui sous-entend avec la quantité de monomères apportée.

Enfin, la résistance thermique des microcapsules dépend directement des propriétés structurales du polymère qui sont régies par la nature des monomères sélectionnées [54].

II.9.4. Avantages et inconvénients de la libération contrôlée :

II.9.4.1. Avantages :

En contrôlant la vitesse de libération du PA à partir de la forme pharmaceutique, les formes à libération prolongée offrent plusieurs avantages par rapport aux autres formes :

-) La réduction des prises journalières.
-) Accroissement du confort du malade.
-) Amélioration de l'observance du traitement.
-) Diminution des effets secondaires indésirables par suppression des pics plasmatiques.

II.9.4.2. Inconvénients :

-) Risque d'accumulation de principe actif si la vitesse d'élimination est lente et si la présence du médicament dans l'organisme est nécessaire 24 heures par jour.
-) Difficulté d'interrompre le traitement rapidement en cas d'intoxication grave ou d'intolérance.
-) Efficacité faible ou nul si le principe actif est mal absorbé au niveau du site d'administration ou de libération.
-) Manque de reproductibilité ou de régularité de la réponse thérapeutique dans certaines conditions physiologiques
-) Risque de toxicité dû au relargage de toute la dose pour les principes actifs de faible index thérapeutique et de toxicité élevée. [54]

II.10. Conclusion :

On conclure que la microencapsulation permet de préparer des particules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active. Les particules obtenues se

divisent en 2 types : les microsphères et les microcapsules. La qualité des microparticules dépend du type de matériau d'encapsulation et le procédé utilisé. Les microparticules préparées par les procédés d'encapsulation physico-chimiques ont la plus petite taille dont elle est comprise entre [0.5 et 1200 μm].

Les systèmes pharmaceutiques encapsulés à base des biomatériaux donnent une libération contrôlée d'un principe actif très peu soluble des microparticules obtenues. Le développement d'une formulation à libération contrôlée permet ainsi de diminuer les effets secondaires du principe actif et de réduire le nombre de prises en prolongeant l'action analgésique. Cela permet également de pallier au problème des principes actifs à faible temps de demi-vie. Afin de contrôler le relargage du principe actif au cours du temps, celui-ci est formulé de façon à être contenu dans un "Transporteur de drogue", encapsulé, enrobé ou retenu dans une matrice d'où il sera progressivement libéré.



Chapitre III: Résultats et discussion



III.1. Introduction :

En vue d’arriver à cerner la question de l’effet de synergie de l’action antibactérienne entre les deux substances, et en raison de la limite de références liées à ce sujet, nous nous sommes limité à une revue de quelques résultats relatifs à l’encapsulation séparée des deux substances, la doxycycline et le lysozyme de certains travaux antérieurs.

Dans un premier temps, nous avons relevé le matériel et méthodes utilisés dans ce genre de travaux. Dans un deuxième temps, nous avons récapitulé quelques résultats en essayant de soustraire des interprétations.

III.2. Matériels et méthodes :

Le matériel et méthodes utilisés dans les études relatives à l’encapsulation du lysozyme et de la doxycycline sont portés dans le tableau ci-dessous:

	Méthodes de preparation	Matériels	Méthodes de caractérisation	Réf
Extraction de lysozyme	ATPS	*Œuf de poule. *PEG (50%w/w; 1500, 6000, 8000, 20000). *Méthanol (20%). *Phosphate de sodium (30%, w/w). *Citrate de sodium (30%, w/w). *Sulfate de sodium (30%, w/w), *HCl, *NaCl. *glycérol (20%). *tampon phosphate10%. * Acide acétique (10%)	*Analyse SDS-PAGE.	[43]

	Adsorption	* NaOH (30%) *Acidetrifluoroacétique *β-cyclodextrin polymères (P-CDPs)	*Spectroscopie (FT-IR). *Chromatographie	[44]
	Chromatographie colorant-ligand	*Œuf de poule *HEMA (2ml) * Acide acétique (1%) * NaOH(1%) * Cs (1%) * NaCl (1M) * RR-120, -120, RB-4 (300mg), eau (10ml)	*SEM *HPLC	[45]
Encapsulation de lysozyme	Emulsion	* Chlorure de lysozyme de blanc d'œuf de poule * Alginate de sodium (200 KDa, 200 mPa et 80-90%) * Chitosane CL 213 (150 kDa, 80-90%) * HPMC (90 SH-4000 SR)	*HPLC * spectroscopie Corrélation photonique (Zetasizer 3000 HSA, Malvern Instruments)	[56]
Encapsulation de doxycycline	Evaporation de Solvant (émulsion E/H/E)	*PLGA ₂ (5002, 5002A). *PVA (20000-30000). *DCM. *EtOH. *NaCl. *Rapport glycolide. *FBS *Tampon phosphate.* eau	*spectroscopie (FT-IR). *Microscopie (Zeiss Sigma 300 VP-FESEM)	[57]
	Electrospraying	*Doxycycline hyclate *PLGA1(P2-D, P4-D, P2A-D, P4A-D) *Acetone (0.16 g/mL)	*SEM. *DLS *HPLC	[58]

III.3. Résultats et discussion :

III.3.1. Extraction du lysozyme d'œuf de poule :

Plusieurs facteurs peuvent intervenir et avoir un impact sur le procédé d'extraction du lysozyme extrait à partir de l'œuf de poule. On considèrera, dans ce qui suit quelques paramètres essentiels pour l'obtention du lysozyme.

III.3.1.1. Effet du type de sel sur l'extraction du lysozyme :

Dans la préparation de lysozyme, il a été noté l'usage nécessaire d'un sel conduisant à l'obtention du lysozyme par extraction liquide-liquide. Ainsi, lors des travaux, quelques types de sels ont été testés en se basant sur leur impact sur le procédé d'extraction. Dans ce qui suit, on a reporté dans le tableau III.1 la variation de l'activité du lysozyme en fonction du sel employé.

Tab.III.1. L'influence de la nature du sel sur l'activité du lysozyme [43].

Poids du PEG (10%, w/w)	Sel (12%, w/w)	Activité du lysozyme (unité/ml)
PEG1500	Phosphate	2300
	Citrate	3700
	Sulfate	6350

Les valeurs du tableau II.1 montrent que l'activité du lysozyme varie sensiblement avec la nature du sel utilisé. En effet, on peut observer que l'activité du lysozyme augmente de 2300 u/ml pour le cas du sel de phosphate à 6350 u/ml pour le cas du sel de sulfate, en passant par 3700 u/ml pour le sel de citrate. De là, on peut dire que le sulfate est le mieux adapté pour donner un lysozyme de haute activité.

III.3.1.2. Effet du poids moléculaire de PEG :

Un autre facteur qui pourrait avoir son influence sur le procédé d'extraction du lysozyme est le polyéthylène glycol (PEG). Dans le tableau III.2, on a reporté les résultats relatifs à l'influence du type du PEG sur la nature du lysozyme obtenu.

Tab.III.2. Effet du type du PEG [43] :

Poids du PEG (10%, w/w)	Sel formateur de phase (12%, w/w)	Activité du lysozyme (unité/ml)
PEG 1500	Sulfate	7200
PEG2000	Sulfate	8800
PEG6000	Sulfate	2900
PEG20000	Sulfate	3800

En maintenant le même type de sel de sulfate ayant donné meilleur résultats dans l'étape précédente et en variant le type de PEG, on remarque que ce dernier présente une influence considérable sur la nature du lysozyme obtenu. En effet, de la valeur d'activité du lysozyme minimale de 2900 u/ml obtenue pour le PEG 6000 à une valeur de 8800 u/ml sera obtenue pour le PEG 2000.

Il s'avère, à travers les valeurs portées sur le tableau, que l'activité du lysozyme obtenu est importante lors de l'usage du PEG de poids moléculaire faible. On peut relever les valeurs d'activité de 7200 et 8800 pour les PEG 1500 et 2000. De ce fait, on peut conclure que lorsque la chaîne moléculaire du PEG augmente, le lysozyme extrait est faible. Ceci peut être expliqué par la valeur de viscosité de la phase organique qui influe évidemment sur le procédé d'extraction.

III.3.1.3. Effet de pH :

En vue de procédé à la séparation du lysozyme, il a été envisagé l'usage du polymère à base de cyclodextrine carboxylé. Cette séparation a été effectuée en procédant à différents pH et les valeurs obtenues sont portées sur la figure III.1.

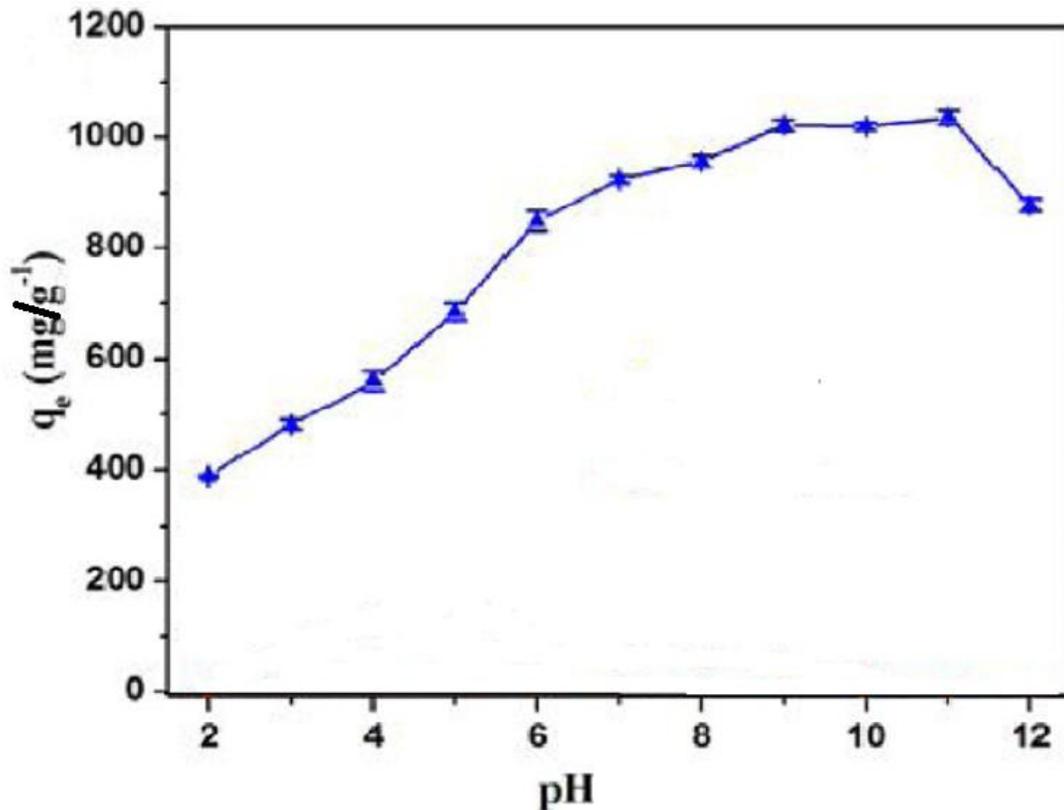


Fig.III.1. Effet de la valeur du pH sur d'adsorption du lysozyme [44].

q_e : La quantité adsorbée de lysozyme par unité de masse d'adsorbant à l'équilibre.

Comme le montre la (Fig III.1), la capacité d'adsorption croît progressivement avec l'élévation du pH de la solution. Le maximum d'adsorption est atteint vers le pH9. De pH 9 à 11, on observe une adsorption constante ensuite au-delà, on remarque une décroissance.

Ceci est expliqué par le fait que le lysozyme est chargé positivement en dessous de pH=11, ce qui lui permet d'être adsorbé à la surface du polymère chargé négativement. En élevant le pH, le carboxyle attaché au polymère est déprotoné conduisant ainsi à la stabilité du complexe polymère-lysozyme [44].

En vue de voir l'impact de la nature de la membrane sur la capacité de séparation, deux types de membranes ont été utilisées. Les valeurs sont portées sur la figure III.2 ci-dessous

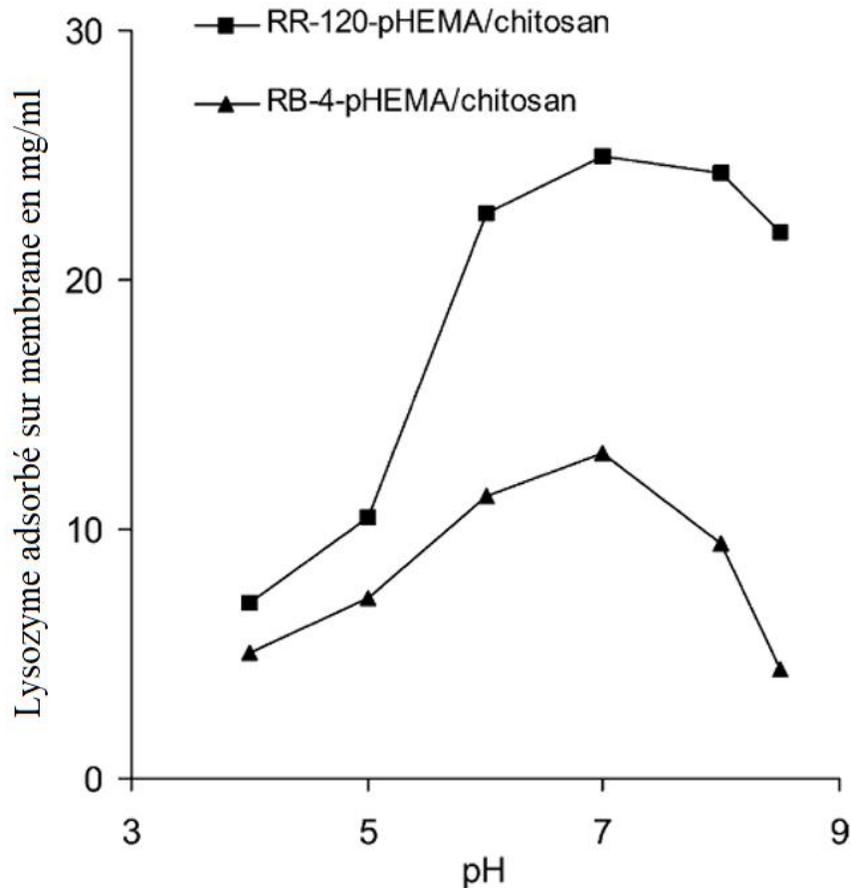


Fig.III.2. Effet de pH sur la quantité du lysozyme adsorbé sur des membranes composites immobilisées de colorant-ligand [45].

En choisissant le chitosan comme polymère de base sur lequel on immobilise deux colorants différents le bleu-4 et le rouge-4, on obtient deux surfaces différentes. On observe une variation de la quantité de lysozyme adsorbé. La valeur maximale de lysozyme adsorbée a été obtenue à pH=7 : 13,1 mg / ml avec le colorant Bleu-4 et 25 mg / ml avec le RB-4. Il ressort que non seulement le pH comme facteur influant l'adsorption mais également la nature de la surface de la membrane utilisée. Effectivement le pH intervenant dans la variation de l'état de la surface et par conséquent sur la quantité de lysozyme adsorbé. On remarque à travers le profil de la courbe qu'il y a une interaction préférentielle entre le lysozyme et les membranes des colorants à pH=7.

Le colorant Bleu-4 a deux groupes sulfones acides et un groupe amine primaire et la molécule rouge-120 a six groupes sulfones. Ainsi, la liaison du lysozyme sur les membranes immobilisées par des colorants qui représentent une combinaison d'hydrophobes conduit à des interactions

d'échange d'ions. Ceci explique la différence entre les deux valeurs de la quantité du lysozyme adsorbé par les deux colorants [45].

III.3.1.4. Effet de la concentration de NaCl :

L'usage de NaCl est d'habitude utilisé pour stabiliser la densité de la solution aqueuse dans les opérations d'extraction. Dans cette étape de séparation de lysozyme et son comportement vis-à-vis des membranes ou des colorants sont immobilisés sur leur surface en optant à l'emploi du sel de chlorure de sodium et voir son influence sur la capacité d'adsorption du lysozyme. Les résultats relatifs à cette adsorption sont reportés sur la figure III.3 ci-dessous.

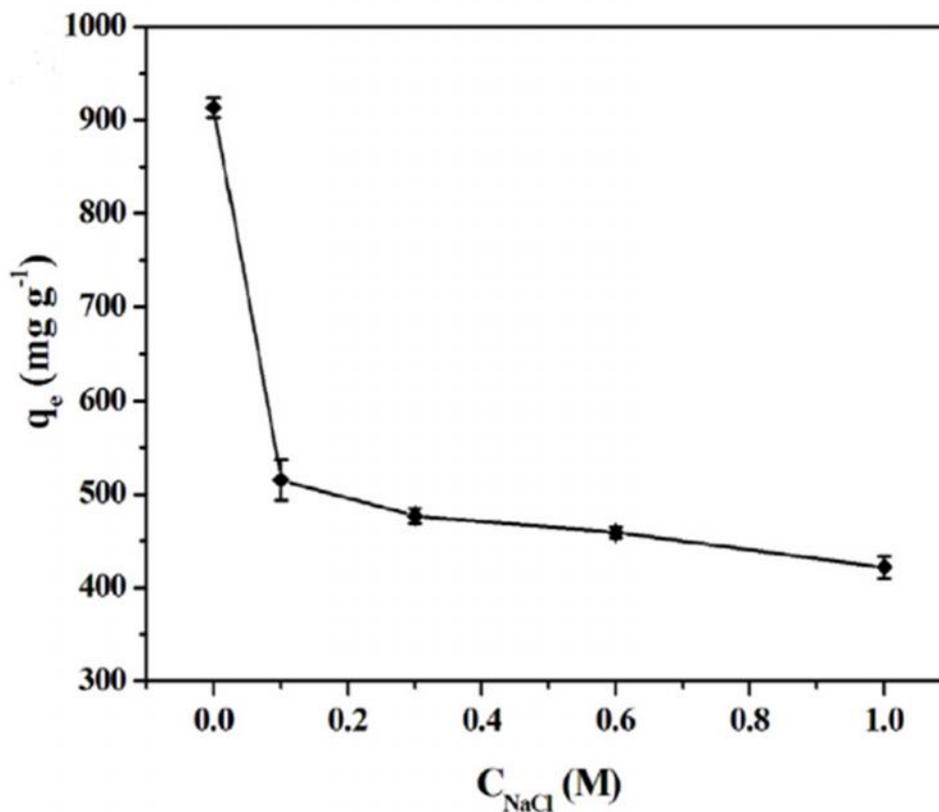


Fig.III.3. Effet de la valeur de la concentration de NaCl [44].

A partir de la courbe III.3, on observe que la quantité du lysozyme adsorbée est affectée par la force ionique induite par l'ajout du sel de sodium. L'ajout de NaCl peut générer des ions Na^+ qui peuvent entrer en compétition avec le lysozyme et interagir avec le $P\text{-CDP-COO}^-$, conduisant ainsi

à la diminution de la quantité d'adsorption de lysozyme et ce suite à l'augmentation de la force ionique. Ceci nous mène à dire que la principale force motrice intervenant dans le phénomène de l'adsorption du lysozyme sur le P-CDP-COO⁻ est l'interaction électrostatique, ce qui signifie également que l'ajout de NaCl à haute concentration favorise l'élution du lysozyme adsorbé sur le P-CDP-COO⁻ [45].

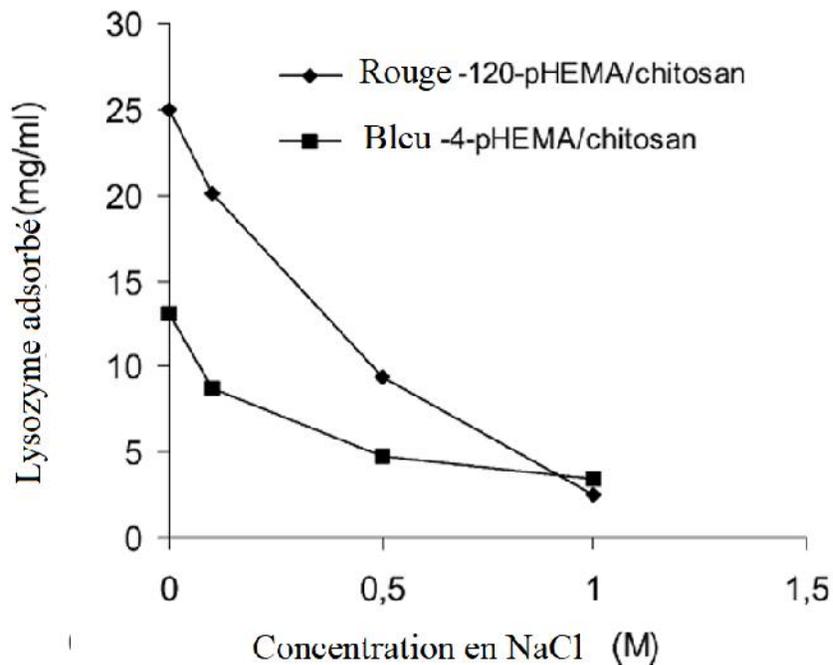


Fig.III.4. Effet de la concentration de NaCl [45].

On peut relever une diminution de la capacité d'adsorption du Bleu-4 et Rouge-120 vis-à-vis du lysozyme avec l'accroissement de sel de sodium. La diminution des capacités d'adsorption du lysozyme des deux membranes immobilisées colorant-ligands résulte de la diminution des interactions électrostatiques entre le lysozyme et les molécules de colorant. Ceci peut être expliqué par l'augmentation de la force ionique induite par l'augmentation de la concentration du sel de sodium [45].

III.3.1.5. Effet de température :

Un autre paramètre a été considéré pour l'étude de la séparation du lysozyme sur des membranes de chitosan ou des colorants ont été immobilisés sur la surface du polymère en l'occurrence la température. Les capacités d'adsorption et les taux de liaison de lysozyme aux membranes

composites immobilisés de Bleu-4 et Rouge-120 obtenus à différentes températures sont illustrées sur les (Fig.III.5 et III. 6).

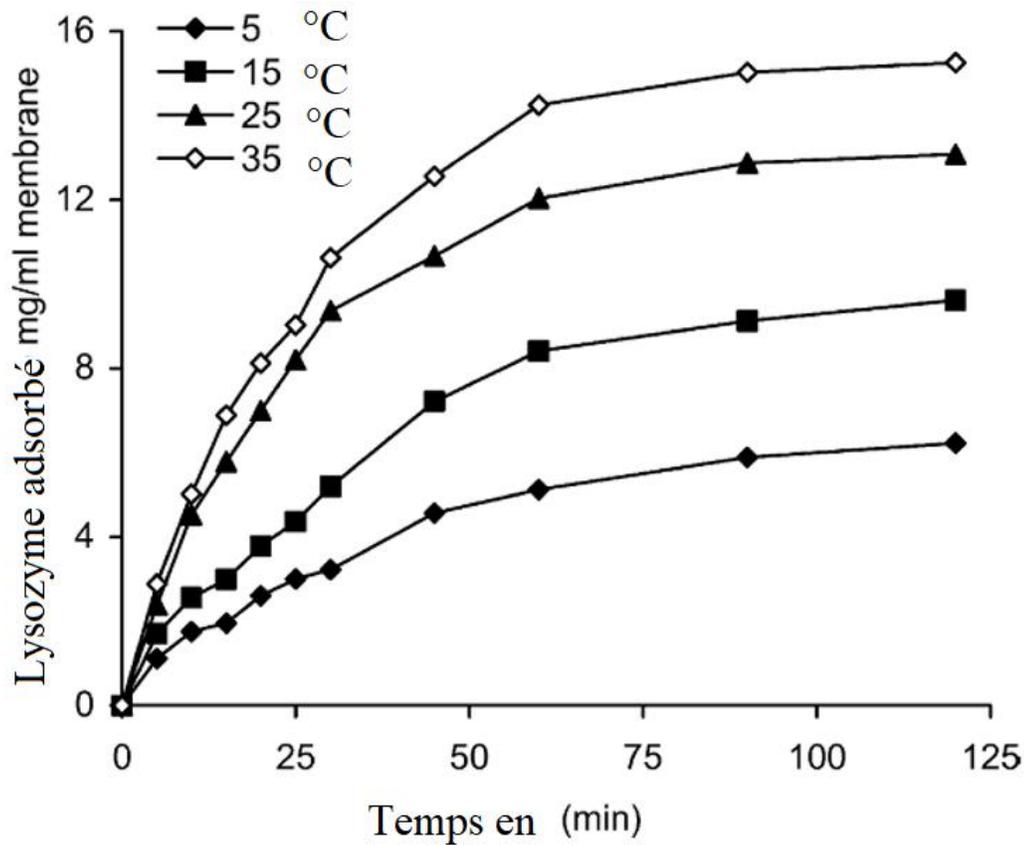


Fig.III.5. Effet de la température sur la capacité d'adsorption du lysozyme sur la membrane composite immobilisée de Bleu-40 [45].

L'adsorption du lysozyme à l'équilibre sur tous les adsorbants testés a sensiblement augmentée avec l'accroissement de la température. À une température plus élevée, la zone de contact entre le lysozyme et la membrane devrait augmenter, entraînant une augmentation de l'affinité du lysozyme pour les adsorbants. On relève qu'à la température allant de 5 à 35°C, la capacité d'adsorption du lysozyme par les membranes composites avec le Bleu-4 et Rouge-120 immobilisées s'est accrue de 145% et 39% respectivement.

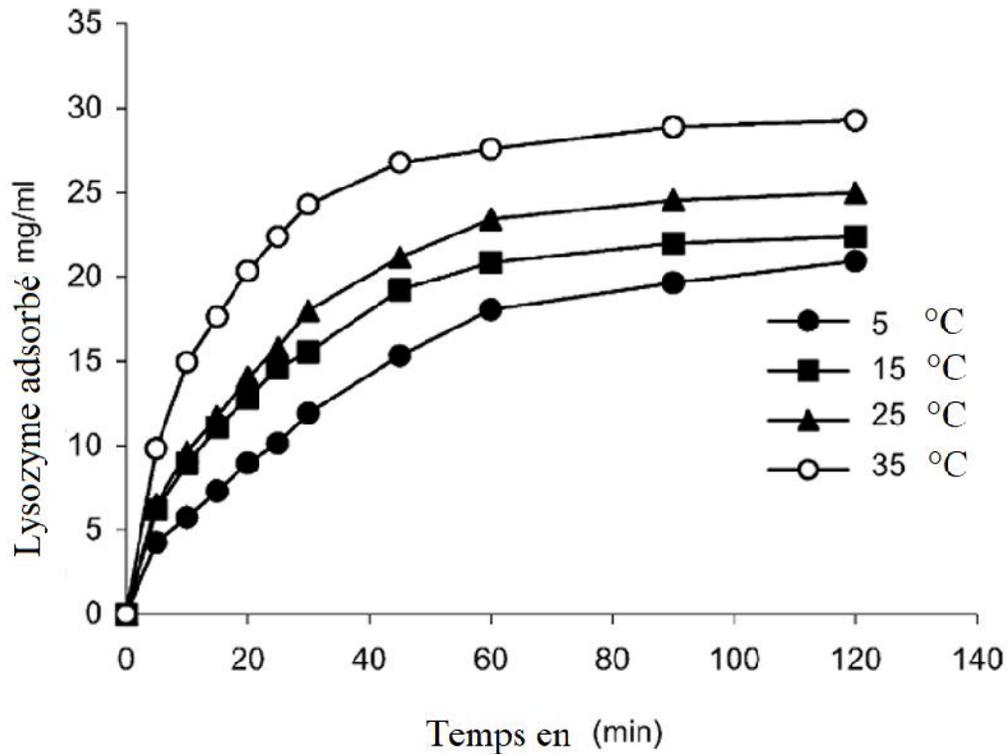


Fig.III.6. Effet de la température sur la capacité d'adsorption du lysozyme sur la membrane composite immobilisée de Rouge-120 [45].

Il faut noter que la capacité d'adsorption serait améliorée au-dessus de 35°C tandis que le lysozyme perdrait son activité à une température plus élevée. Ces implications peuvent être attribuées à une augmentation de l'interaction hydrophobe entre le colorant et les molécules de lysozyme. Cette augmentation paraît plus prononcée pour la membrane immobilisée Bleu-4 [45].

III.3.1.6. Evaluation de l'activité antibactérienne du lysozyme :

L'évaluation de l'activité antibactérienne du lysozyme du blanc d'œuf est réalisée sur des souches bactériennes *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus Epidermidis* et *Escherichia coli*, par la méthode de diffusion en puits sur un milieu gélosé.

Les diamètres d'inhibition relevés pour les lysozymes extrait par le système biphasique (PEG/Sulfate) et celui extrait par éthanol sont portés dans le tableau III.3

Tab.III.3. Diamètre d'inhibition des souches testées par le lysozyme :

Souches bactériennes	% de lysozyme	Diamètre d'inhibition [mm]	Observation	Références
E. Coli	100	-	-	[55]
	70	-	-	
	40	-	-	[30]
	20	-	-	
S. Aureus	100	20	Inhibition	[55]
	70	15	Inhibition	
	40	24	Inhibition	[30]
	20	18	Inhibition	
S. Epidermidis	100	27	Inhibition	[55]
	70	13	Inhibition	

) Le lysozyme à 70% et 100% est extrait par le système biphasique aqueux (PEG/sulfate).

) Le lysozyme à 20% et 40% est extrait par l'éthanol.

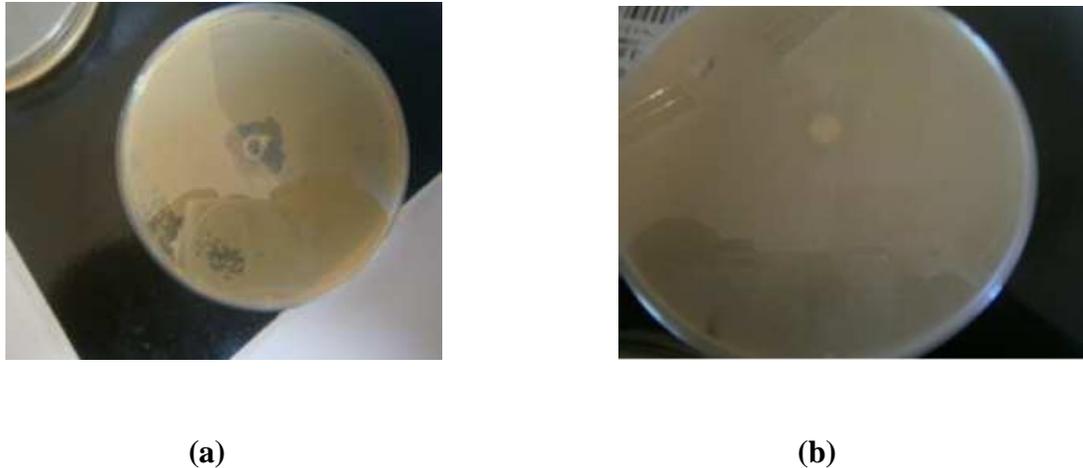


Fig.III.7. Diamètre d'inhibition du lysozyme sur *S.Aureus* (a); *E.Coli* (b) [30].

D'après les résultats du tableau on remarque que les souches microbiennes de *S. Aureus* et *S. Epidermidis* testées sont sensibles à l'action antibactérienne des différents extraits du lysozyme obtenus, alors que chez *E.Coli*, une résistance au lysozyme a été observée (Fig III.9.b). Il a été remarqué que l'effet antibactérien du lysozyme semble élevé avec les échantillons non dilués alors que pour ceux dilués, la sensibilité des souches microbiennes est réduite.

On peut ressortir de ces données que la méthode d'extraction de lysozyme et ses paramètres ainsi que les produits utilisés ont un impact important sur la qualité et la quantité du lysozyme obtenu et par suite l'impact sur son activité.

III.3.2. Microencapsulation de la doxycycline et du lysozyme :

Dans cette partie, on va considérer le sujet de la microencapsulation des deux principes actifs la doxycycline et le lysozyme. En raison d'absence de références sur la co-encapsulation des deux substances, nous avons traité la microencapsulation de chaque substance active à part.

III.3.2.1. Microencapsulation de lysozyme :

L'encapsulation du lysozyme dans une matrice polymérique à base d'alginate, de chitosan, et de l'hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) a conduit à l'obtention des particules de différentes caractéristiques.

III.3.2.1.1. Caractéristiques des particules de lysozyme :

Les différents résultats relatifs à la caractérisation des particules obtenues sont portés dans le tableau III.4 ci-dessus

Tab.III.4. Caractéristiques des microsphères de lysozyme [56] :

N° des Microsphères	Alginate (% w/v)	CaCl ₂ (% w/v)	Cs (% w/v)	HPMC	Diamètre des MS (µm)	Diamètre Gonflé (µm)	Degré de gonflement %	Efficacité d'encapsulation	libération de LYS pH3 (%)	libération de LYS pH8 (%)	libération totale LYS (%)
MS1	2	10	0.1	+	2.4	2.9	21	15.3	6.3	85.8	92.1
MS2	3	12	0.2	+	3	4.2	40	22.5	6.3	21.5	27.8
MS3	4	15	0.5	+	2.1	2.7	29	22.2	13.1	49	61.1
MS4	3	15	0.1	-	3.1	3.3	6	16.3	5.9	63	68.9
MS5	4	10	0.2	-	4.2	4.5	7	13.5	8.9	70.8	79.7
MS6	2	12	0.5	-	3.1	3.3	6	4.8	34.4	65.6	100
MS7	4	12	0.1	+	2.1	3.1	48	9.7	24.2	66.5	90.7
MS8	2	15	0.2	+	2.3	3.6	56	8.8	13.9	22.3	36.2
MS9	3	10	0.5	+	2.6	2.9	11	24.5	7,2	23.8	31
MS10	4	15	0.1	+	2.7	3.2	18	45.5	6.9	33.9	40.8

La variation des concentrations des polymères (Alginate, Chitosan et HPMC) utilisés dans l'encapsulation du lysozyme donne des particules de dimensions et caractéristiques variées. Cependant, ces particules montrent dans certains cas des similitudes. En effet, pour le cas de la morphologie, l'analyse par microscopie électronique à balayage a montré que les particules présentent des formes sphériques avec une surface rugueuse (Fig.III.8).

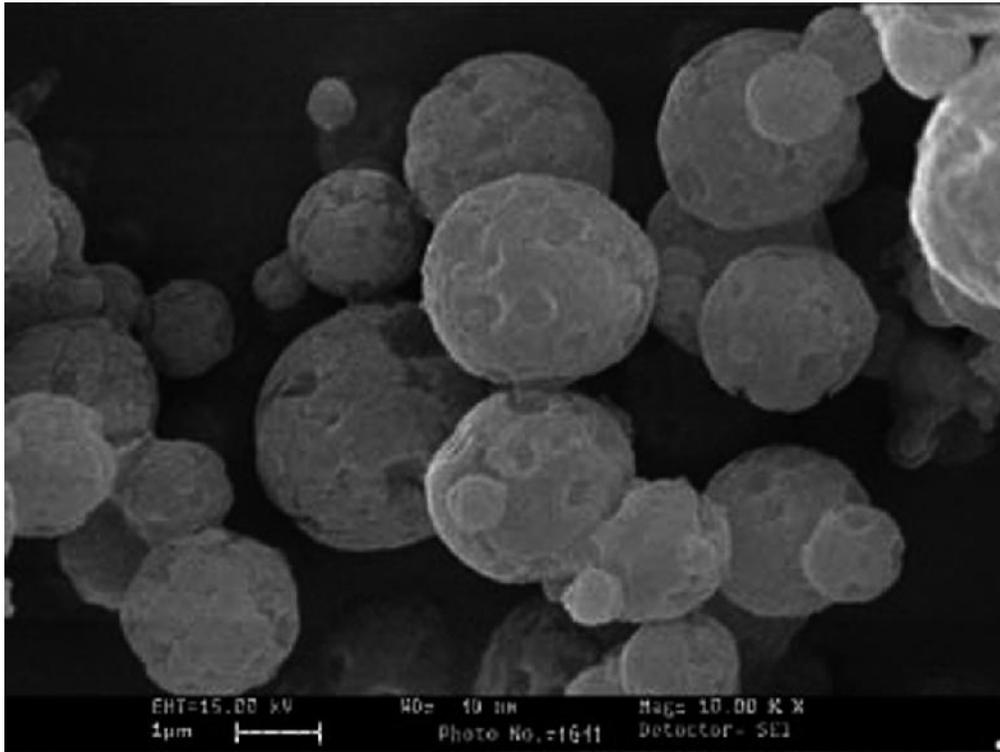


Fig.III.8. MEB de la morphologie des microsphères d'alginate enduit de chitosane. Agrandissement 10k x [56].

Concernant la taille des particules, on peut relever à partir du tableau III.4 que les diamètres des particules varient dans la fourchette [2.1-4.2 μm]. L'usage de HPMC (Hydroxypropylméthyl cellulose) avec les deux polymères (chitosan et alginate) dans la formulation a permis la production de microsphères avec un diamètre variant dans le domaine [2.1-3.1 μm] alors que celles préparées seulement avec les chitosan et alginate ont une taille qui varie dans la fourchette [3.1-4.2 μm]. C'est une évidence, l'ajout d'un troisième polymère conduit la croissance de la taille. Ceci, bien sûr ne peut être toujours le cas, il dépend notamment de la méthode de préparation.

III.3.2.1.2. Efficacité d'encapsulation [56] :

L'efficacité d'encapsulation qui nous renseigne sur la faisabilité de la méthode de préparation employée, nous informe de la quantité de produit qu'on peut incorporer dans la matrice. Il ressort des valeurs du tableau III.4, que le meilleur taux d'encapsulation obtenu (45,5%) est celui des particules préparées avec 4% d'alginate, 0.1% de chitosane en présence de HPMC réticulées avec

15% de CaCl₂. Il paraît clairement que dans ce cas, la membrane formée avec une épaisseur assez conséquente vu que la concentration de l'alginate est de 4% et en plus du chitosan et de HPMC et 15% de réticulant. On peut dire que l'efficacité d'encapsulation augmente avec la concentration de l'alginate utilisé ainsi que la concentration du réticulant et de la concentration du chitosane. Le réticulant est nécessaire en quantité suffisante pour permettre la réticulation de tout l'alginate disponible dans la solution. De même, la concentration du chitosane intervient également dans la consolidation de la membrane de la matrice polymérique. D'ailleurs, on relève cette remarque pour la concentration de 3% d'alginate, 10% de CaCl₂ et 0.5% de chitosane, l'efficacité est 24.5 % alors que pour le cas de 3% d'alginate, 15% de CaCl₂ et 0.1% de chitosane, l'efficacité d'encapsulation est réduite à 16.3%.

Nous pouvons ressortir que la nature et le nombre des polymères, leur concentration, le réticulant et sa concentration interviennent dans la grandeur de l'efficacité de l'encapsulation. Effectivement chaque polymère présente les caractéristiques spécifiques qui permettent en finalité de concevoir la membrane suite aux interactions induites entre le polymère et polymère et entre le polymère et réticulant.

III.3.2.1.3. Libération de lysozyme :

L'étude de libération de lysozyme est la méthode permettant de confirmer le taux d'encapsulation et l'efficacité d'encapsulation. L'étude en question est réalisée généralement pour comprendre le comportement des particules obtenues de l'encapsulation dans les milieux physiologiques gastrique et intestinal. Des résultats du tableau III.4, on relève une résistance des particules vis-à-vis du pH gastrique (pH3) alors qu'on observe des valeurs importantes dans le milieu simulé intestinal. Cependant, le comportement des particules dans les deux milieux varie par rapport à la matrice conçue.

La libération du lysozyme est obtenue soit après gonflement des particules soit par érosion dans les milieux correspondants. On remarque que l'usage de HPMC dans la conception des membranes facilite mieux l'absorption du liquide du milieu et conduit au gonflement des particules. Ceci est expliqué par la nature de HPMC qui forme des liaisons chimiques et physiques avec les deux polymères le chitosane et l'alginate. D'ailleurs, on note pour les formulations MS-2, MS-7 et MS-8, les taux de gonflement sont respectivement 40%, 48% et 56%. Dans ce cas, la libération est

lente, alors que pour les particules MS-1, MS-4, MS-5 et MS-6, les taux de libérations dans le milieu à pH8 sont assez élevés et correspondent à 85.5, 63, 70.8 et 65.6 % [56].

I.3.2.2. Microencapsulation de la doxycycline :

La considération des travaux liés à l'encapsulation de la doxycycline par les deux méthodes électropulvérisation (electrospraying) et par évaporation de solvant. L'encapsulation est réalisée par l'usage du co-polymère (Acide polylactique co-glycolique). Les différentes tailles obtenues sont présentées dans le tableau III.5.

Il ressort des valeurs du tableau que les particules obtenues par les deux méthodes présentent une différence notable dans la taille. En effet, pour la méthode d'évaporation de solvant, les tailles varient de 2.17 à 8 µm, alors que la taille de celles obtenues par l'électropulvérisation est de petite taille (1 µm).

L'examen de la morphologie et de la distribution de la taille des particules observée par le microscope électronique à balayage (figures III. 10 et III.11). Les particules par les deux méthodes sont de forme sphérique avec une surface lisse. Cependant, la distribution de la taille est intimement liée à la méthode utilisée. Pour le cas de la méthode évaporation de solvant, le pH de la phase aqueuse influe sur la dimension et également sur la distribution de la taille. Un autre paramètre peut intervenir dans la variation de ces grandeurs à savoir le polymère, sa concentration ainsi que sa nature (polymère modifié).

Tableau III.5 : Taille des particules obtenues par l'encapsulation de la doxycycline

Formulation	Type de groupe terminale de PLGA	pH de la phase aqueuse	Taille des microsphères (µm)	Technique d'encapsulation	Ref
D1	5002	5.5	3.16	Evaporation de solvant	[57]
D2		7	4.59		
D3		9	2.17		
D4	5002+co-solvant	5.5	7.78		
D5		7	5.63		

D6	5002A	9	6.55	Electrospra ying	[58]
D7		5.5	5.09		
D8		7	6.44		
D9		9	4.53		
D10	5002A+co- solvant	5.5	6.16		
D11		7	8		
D12		9	7.76		
P2-D,	Ester	-	01		
P2A-D	Acide	-	01		
P4-D	Ester	-	01		
P4A-D	Acide	-	01		

La taille moyenne des particules chargées en DOX avec PLGA₂ à terminaison ester et acide se situait respectivement entre 2,17 et 4,59 µm (D1-D3) et 4,53-5,09 µm (D7-D9). Elle est significativement plus élevée pour le cas (D4D6) de 4,53 à 5,09 µm et (D10 D12) 6,16 à 8,00 µm

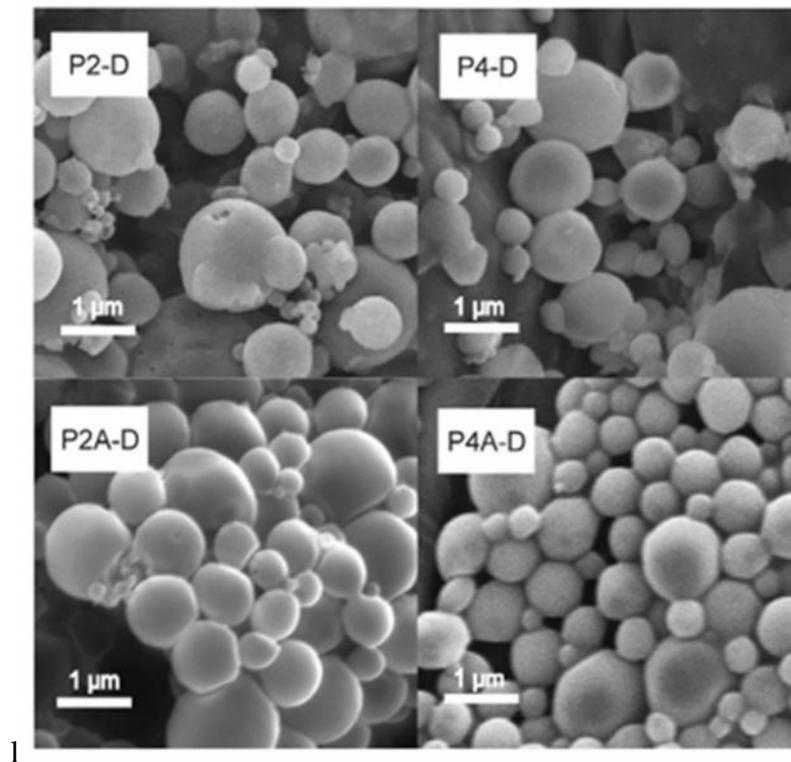


Fig.III.9. Images SEM des microsphères PLGA₁ chargées de DOX préparées selon la technique électrospraying [58].

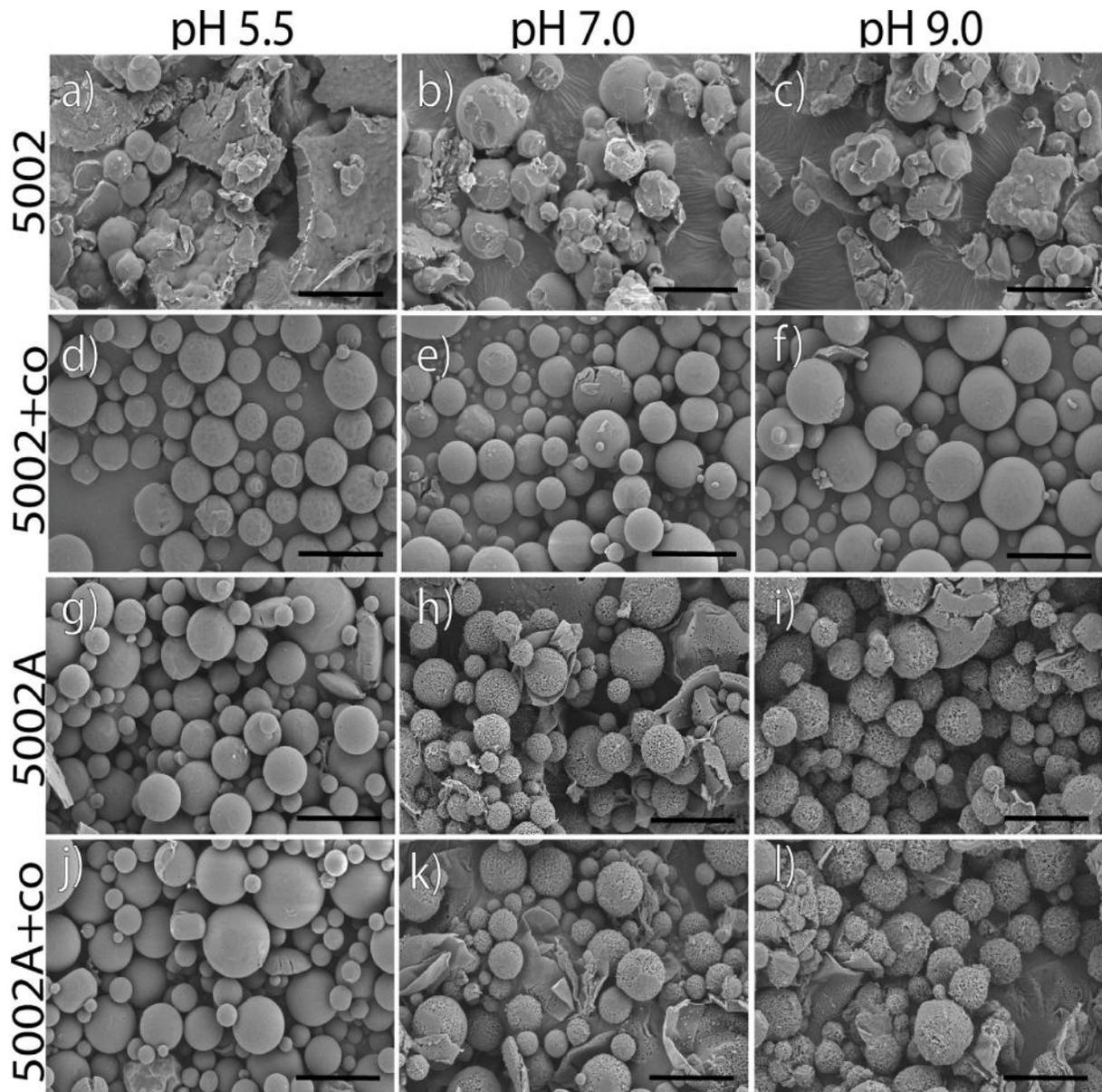


Fig.III.10. Particules PLGA₂ chargées en DOX obtenues par évaporation de solvant [57].

III.3.2.2.1. Efficacité d'encapsulation :

Pour améliorer l'EE des microsphères, deux paramètres ont été étudiés, la solubilité du DOX et le type de groupe terminal du polymère. Les résultats de la (Fig.III.12) démontrent que la solubilité de la DOX a diminuée d'une manière significative avec l'augmentation du pH de [5,5 à 9] par rapport au contrôle (milieu composé de l'eau distillée seule).

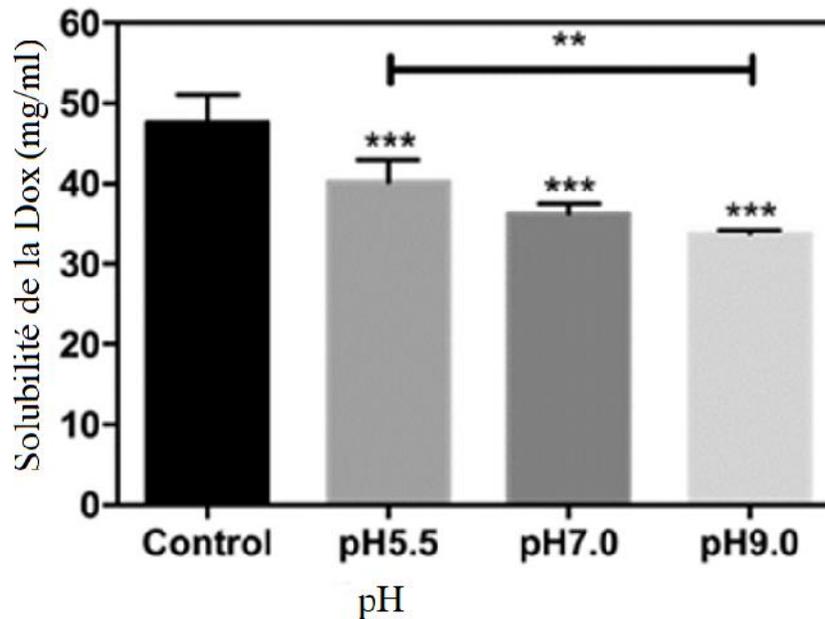


Fig.III.11. Effet du pH sur la solubilité de la DOX [57].

Tab III.6. Efficacité d'encapsulation avec différents groupes terminaux du PLGA :

Groupes terminaux du PLGA		Efficacité d'encapsulation EE%	Capacité de charge LC%	Références
PLGA ₁	P2-D	66,7	4,8	[58]
	P2A-D	40,8	2,8	
PLGA ₂	5002+co	21	1,64	[57]
	5002A	45	9,05	

Par rapport au groupe terminal P2A-D, les microsphères PLGA₁ à base d'ester P2-D ont montrés une efficacité d'encapsulation significativement plus élevée. Une tendance similaire a été observée pour la capacité de charge.

Tandis que, le groupe terminal 5002A a donné une efficacité élevée par rapport au 5002+co-solvant, ceci peut être expliqué par l'effet du pH de la phase aqueuse (pH=9).

III.3.2.2.2. Caractérisation des particules par FT-IR

Les résultats de FT-IR confirment la stabilité chimique de DOX dans les microsphères PLGA₂ en raison de l'apparition de bandes caractéristiques de différents groupes fonctionnels des groupes O-H / N-H et CH₂ à 3388 cm⁻¹ et 1459 cm (Fig.III.13).

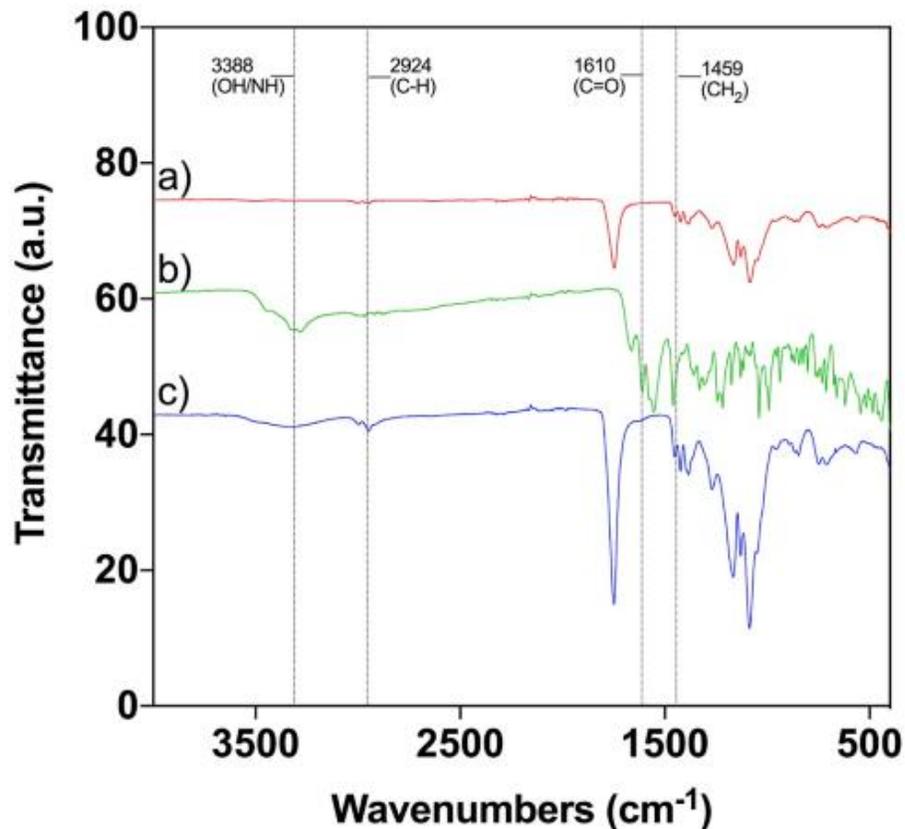


Fig.III.12. Spectres FT-IR de a) microsphères de placebo, b) DOX, c) microsphères PLGA₂ chargées de DOX [57].

Les bandes observées avec les microsphères placebo étaient presque identiques aux microsphères chargées de DOX avec les bandes supplémentaires dues à DOX avec un déplacement mineur. Les microsphères PLGA₂ chargé en DOX peuvent être facilement identifiées par les vastes régions de vibration d'étirement IR des groupes fonctionnels -OH / -NH à 3000-3500 cm⁻¹ en outre, des bandes à 1610 et 1459 cm⁻¹ correspondent respectivement aux vibrations d'étirement du carbonyle (C = O) et de flexion du méthylène (-CH₂) du médicament.

La bande observée entre 1450 et 850 cm^{-1} correspond aux vibrations de flexion C-H du polymère PLGA₂. Ce résultat indique clairement la stabilité chimique du médicament et du polymère pendant le processus de formulation [57].

III.3.2.2.3 Test de dégradation de microsphères PLGA₁ :

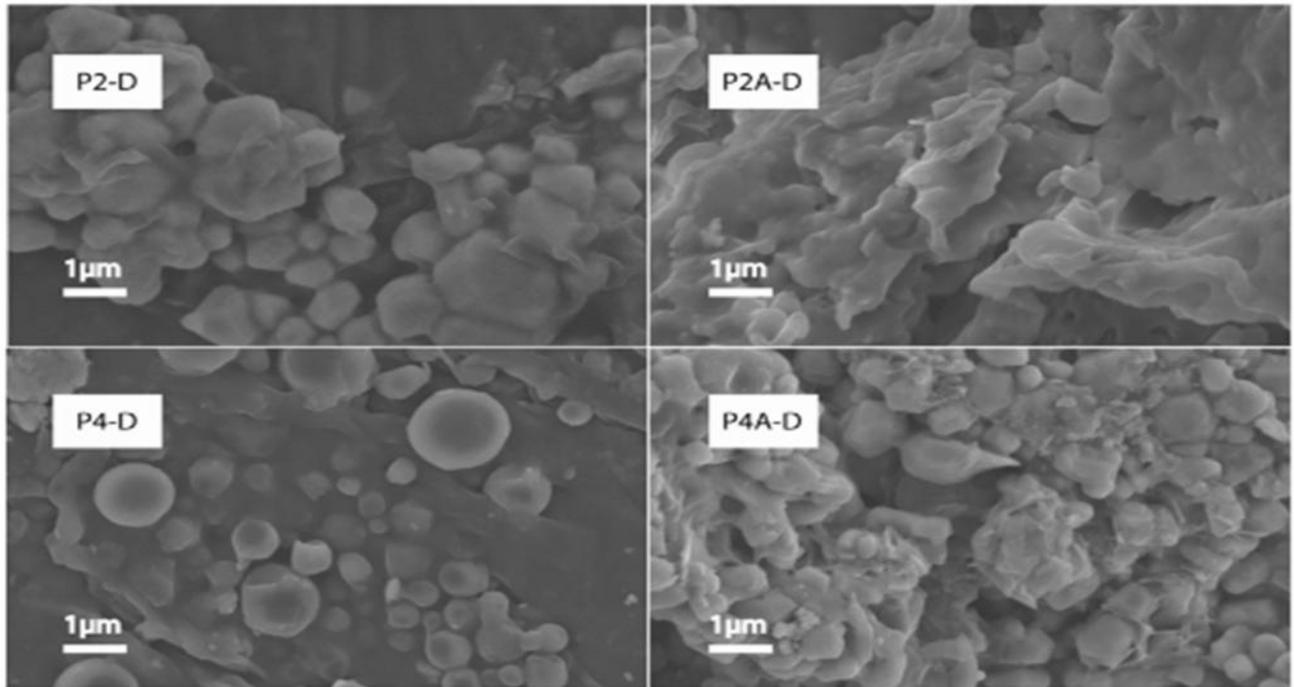


Fig.III.13 Images SEM des microsphères PLGA₁ après 4 jours d'incubation dans PBS [58].

Evidemment, les groupes coiffés en ester ont conservé leur morphologie sphérique, tandis que les microsphères de PLGA₁ à terminaison acide ont perdu la forme ronde et ont fusionné les unes avec les autres.

Le poids moléculaire moyen du PLGA₁ à terminaison acide a diminué plus rapidement que celui de l'ester dans les 4 premiers jours et une dégradation complète après 20 jours. Pour les deux groupes coiffés en ester, la baisse du poids moléculaire a été beaucoup plus lente. Pourtant, le P2-D s'est dégradé presque complètement après 30 jours, tandis que le poids moléculaire moyen du P4-D a diminué de 71% [58].

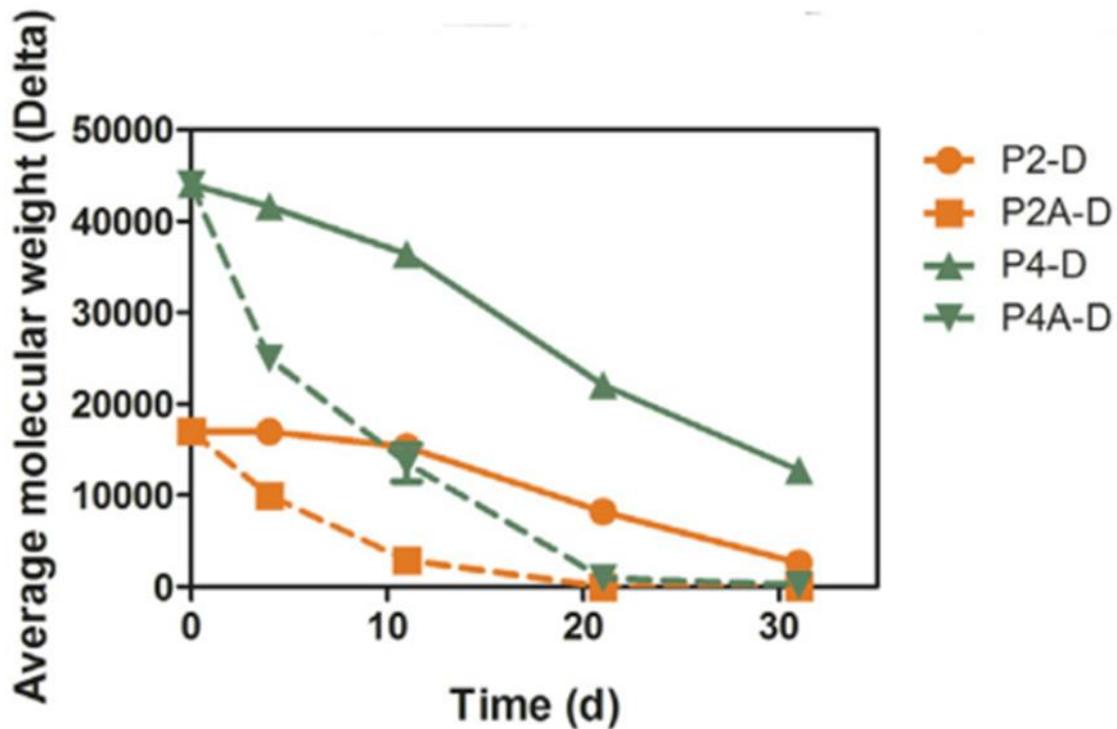


Fig.III.14. Les changements du poids moléculaire moyen des microsphères PLGA₁ pendant le temps d'incubation [58].

Avant l'incubation, les deux microsphères PLGA₁ ont montrés une structure de surface lisse. Après incubation dans du PBS (solution saline au phosphate) pendant 6 h, la surface des microsphères de PLGA₁ à terminaison acide est devenue rugueuse (fig.III.17) et cela a augmenté au cours des deux jours suivants.

Au jour 4, les microsphères avaient presque perdu leur morphologie d'origine. Les fragments, laissés par l'érosion en masse, ont été observés aux jours 7 et 11. Au contraire, la forme ronde et la morphologie lisse des microsphères de PLGA₁ coiffées en ester a été observées jusqu'au jour 11 et les microsphères se sont révélées fragmentées au jour 21 [58].

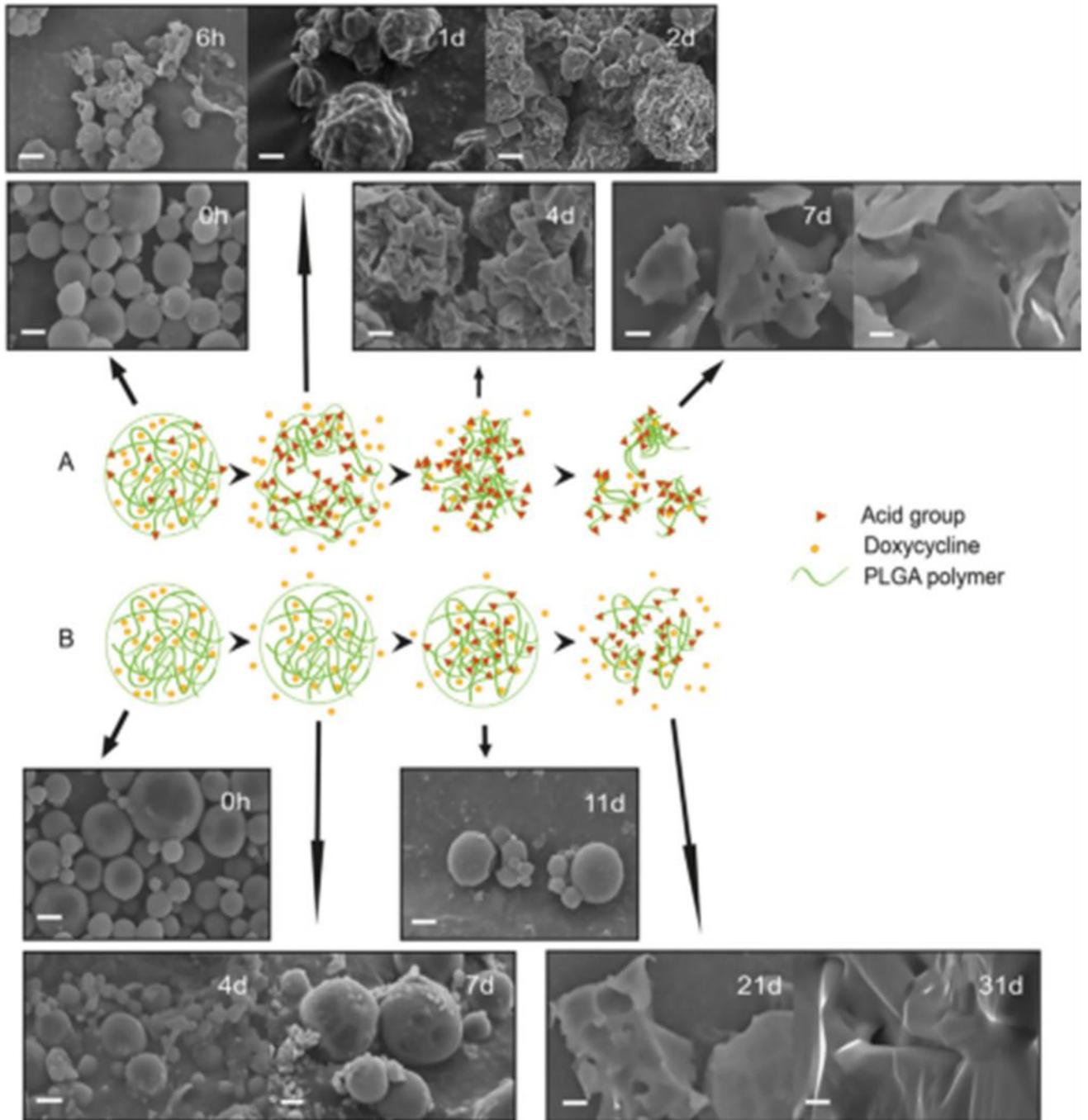


Fig.III.15. Illustration schématique de la dégradation des microsphères PLGA₁ terminaison acide et ester et les micrographies SEM corrélées de P2A-D et P2-D après libération de DOX dans le PBS [58].

III.3.2.2.4. Cinétique de libération de doxycycline in vitro :

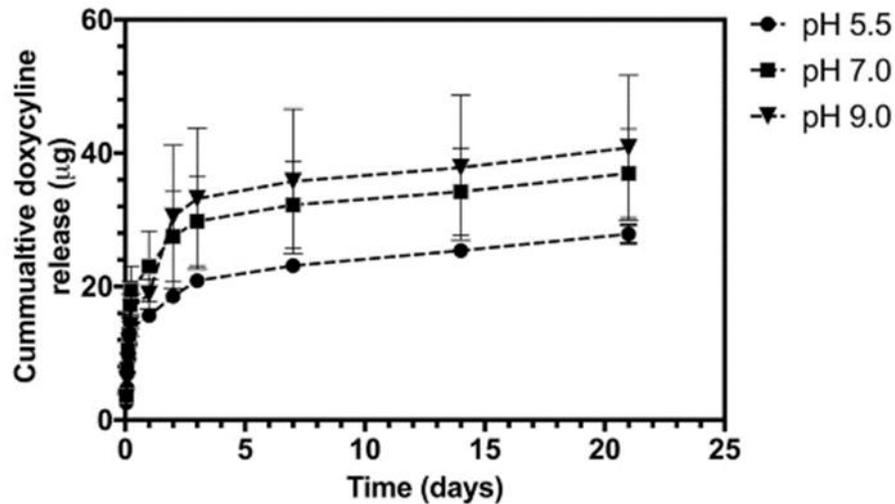


Fig.III.16. Cinétique de libération in vitro de microsphères de PLGA₂ (5002A) [57].

Les microsphères PLGA₂5002A chargés en DOX ont été sélectionnés parce qu'elles contenaient l'EE la plus élevée. Ils ont montré une libération initiale en rafale suivie d'une phase contrôlée dans laquelle le reste du DOX est libéré.

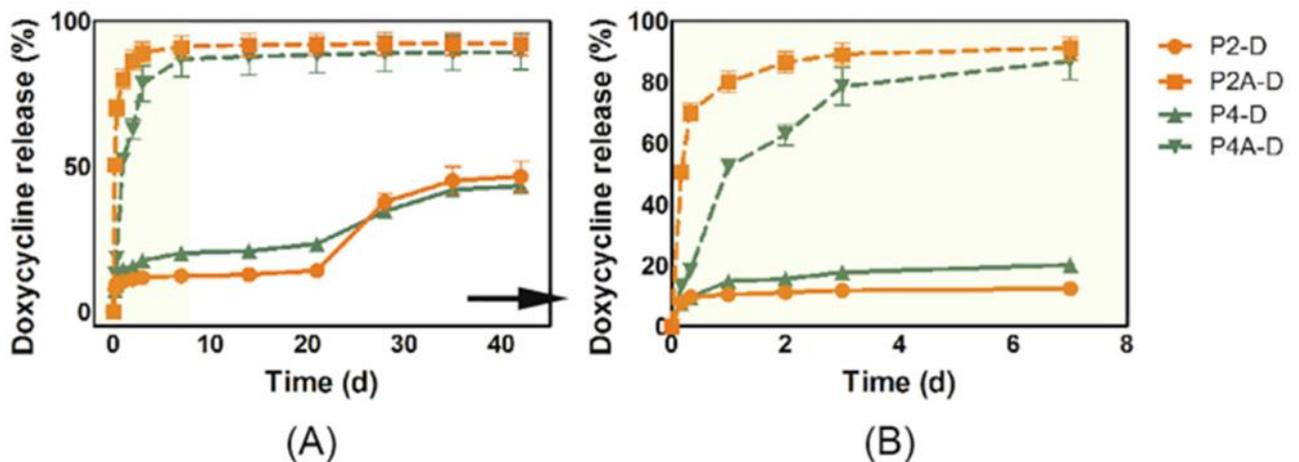


Fig.III.17. (A) Le profil de libération de DOX des microsphères de PLGA₁ pendant 6 semaines, (B) zoom avant sur le profil de libération au cours de la première semaine d'incubation [58].

Dans l'ensemble, un total de [27,87 ; 36,98 et 40,81 µg] de DOX a été libéré à partir de microsphères PLGA₂ formulées avec une phase aqueuse externe W2 de pH = [5,5 ; 7 et 9] respectivement après 21 jours. La vitesse de libération était également plus élevée pour la formulation avec la quantité la plus faible de DOX (c'est-à-dire pH=5,5) et devenait plus lente lorsque la quantité incorporée de DOX était plus élevée, c'est-à-dire pH=7 et pH=9 [57].

Les microsphères de PLGA₁ à terminaison acide affichent seulement une version éclatée. Le test de libération a duré environ 42 jours, qui a abouti à une libération de DOX d'environ 92%, 89%, 47% et 43% pour P2A-D, P4A-D, P2-D et P4-D, respectivement, dans du PBS à 37 ° C [58].

III.3.3. Conclusion :

D'après les résultats précédents, on peut conclure que l'extraction de lysozyme de blanc d'œuf de poule dépend de type de sel, de poids de polymère formateur de phase, la variation des valeurs de pH et de la température, la concentration de NaCl ajouté.

Une purification efficace et peu coûteuse de lysozyme de blanc d'œuf de poule peut être obtenu en utilisant du PEG – sel en ATPS. Le partitionnement de lysozyme peut être dirigé vers la phase supérieure d'un système aqueux biphasique par addition de sel avec contre-ion hydrophobe, tel que le perchlorate de sodium. Quand le PEG-sulfate en ATPS a été utilisé à pH=10 et température (25°C) avec addition de perchlorate de sodium, environ **70%** du lysozyme peut être extraite du blanc d'oeuf de poule.

Le carboxyle-fonctionnalisé P-CDP, c'est un nouvel adsorbant, était synthétisé par un groupe nitrile d'hydrolyse catalysé par une base en carboxyle. L'introduction de carboxyle améliore considérablement la capacité d'adsorption du lysozyme. La quantité maximale d'adsorption de lysozyme à partir de 615 mg.g⁻¹ de P-CDP-COO⁻ de P-CDP s'élève à **1520 mg.g⁻¹**

La pureté du lysozyme extrait du blanc d'œuf était de 84% et 21% et leurs rendements de récupération étaient de **72%** et 16% pour les membranes immobilisées **Rouge-120** et **Bleu-4**, respectivement. La membrane immobilisée Rouge-120 fournit une méthode efficace pour purifier le lysozyme du blanc d'œuf, montrant une capacité d'adsorption élevée et une sélectivité élevée pour le lysozyme. En revanche, le Bleu-4 immobilisé la membrane avait une capacité d'adsorption et une sélectivité inférieures que le Rouge-120 immobilisé.

Parmi les trois méthodes, on constate que la chromatographie colorant-ligand est la meilleure car elle représente la valeur de rendement de récupération de lysozyme la plus élevée (72%) avec une importante pureté (84%) en utilisant la réactif Rouge-120.

Les tests d'action antibactérienne montrent que la sensibilité des souches microbienne (*S. Aureus* et *S. Epidermidis*) au lysozyme est élevée avec les échantillons non dilués, tandis qu'E.Coli fait une résistance au lysozyme.

A partir les résultats de la microencapsulation de lysozyme, on peut dire que les microsphères préparés à partir d'un mélange d'alginate de sodium et HPMC étaient plus sphériques et avec une surface plus lisse que celles préparé avec de l'alginate de sodium uniquement. Le HPMC affecte la taille et le degré de gonflement des microsphères et d'avoir une contribution positive à la viscosité de la solution. L'efficacité d'encapsulation du lysozyme est affectée par la formulation. Le meilleur taux d'encapsulation obtenu (45,5%) est celui des particules préparées avec 4% d'alginate, 0.1% de chitosane en présence de HPMC réticulées avec 15% de CaCl₂.

La libération du lysozyme est considérée lente, elle se fait en milieux intestinal à pH=8 par gonflement de microsphères, dont les taux de libérations les plus élevés sont correspondent à 85.5%, 63, 70.8 et 65.6 % pour les microsphères MS-1, MS-4, MS-5 et MS-6 respectivement.

L'électropulvérisation et l'évaporation de solvant sont les méthodes utilisées pour la microencapsulation de la doxycycline. Les particules obtenues par les deux méthodes ont une forme sphérique avec une surface lisse. Pour la méthode d'évaporation de solvant, la taille varie de 2.17 à 8 µm, alors que la taille de celles obtenues par l'électropulvérisation est de petite taille (1µm). Ces résultats montrent que l'électropulvérisation permette de préparer des microparticules de qualité, avec le bon choix du matériau.

. Les microsphères de PLGA₁ et obtenues par l'électropulvérisation et PLGA₂ par évaporation de solvant affichent une libération par érosion. La vitesse de libération à partir les microsphères PLGA₂ était également plus élevée pour la formulation avec la quantité la plus faible de DOX et devenait plus lente lorsque la quantité incorporée de DOX était plus élevée. Le test de libération a duré environ 42 jours, qui ont abouti à une libération de DOX d'environ 92%, 89% pour P2A-D, P4A-D, respectivement. Une efficacité d'encapsulation du médicament plus faible et une libération plus rapide du médicament ont été trouvées pour les microsphères de PLGA₁ à terminaison acide

par rapport aux microsphères à coiffe ester, ce qui est dû à une différence d'hydrophobicité et de vitesse de dégradation entre les deux types de polymères PLGA₁. Evidemment, cette étude suggère que la combinaison de microsphères de PLGA₁ à coiffe acide et ester avec des profils de libération différents pourrait être tonifiée pour obtenir des profils de libération de médicament spécifiques assurant une efficacité thérapeutique optimale.

Conclusion générale :

A travers cette étude bibliographique relative au lysozyme et doxycycline, on peut tirer les informations suivantes :

Le lysozyme comme substance contenue dans les œufs peut être extraite avec des rendements et qualité variables. Elle présente la capacité d'être antibactérienne qui peut être exploitée et utilisée comme substance naturelle en tant que médicament pour les traitements thérapeutiques de l'infection bactérienne. En outre son encapsulation peut être une issue pour améliorer son efficacité et limiter son surdosage.

La doxycycline, un antibiotique très connu, utilisé sous forme de comprimé pour des traitements thérapeutiques diverses : la brucellose, la pasteurellose, la borréliose, les rickettsioses, les trépanomatoses, le choléra, la leptospirose, la fièvre Q, les infections pulmonaires et génito-urinaires à Chlamydia et à Mycoplasmes, les gonococcies et la maladie du charbon. Son usage sous la forme conventionnelle peut constituer un problème lié à la teneur efficace réelle généralement faible alors que la majeure partie de la dose administrée sera perdue dans l'espace corporel. Ceci peut induire des effets secondaires énormes, en particulier le développement de la résistance aux antibiotiques. Ainsi, son encapsulation serait une alternative pour qu'elle soit utilisée avec efficacité et avec des effets secondaires amoindris. Il a été relevé que plusieurs matériaux peuvent constituer les matrices d'encapsulation et d'obtenir des particules de dimensions acceptables avec une efficacité d'encapsulation appropriées. L'exemple du PLGA, copolymère de l'acide lactique et glycolique donne une illustration de particules stables qui peuvent donner une libération contrôlée.

Cette étude bibliographique nous laisse à notre faim en absence de travail expérimental envisager au début pour l'étude relative à la synergie entre les deux substances antibactériennes.

Enfin, nous souhaitons que ce travail sera reconsidéré pour traiter la possibilité l'encapsulation de l'antibiotique (la doxycycline) avec du lysozyme dans l'objectif de limiter la dose de l'antibiotique dans les traitements thérapeutiques en incorporant une substance naturelle qui est le lysozyme.



références bibliographiques



- [1] J.Dangoumau, N.Moore, M.Molimard, A.Fourrier-reglat, K.Latry, F.Haramburu, G.Miremont, K.Titier, pharmacologie générale. Edition 2006.Université Victor Segan-Bordeaux 2.
- [2] M.Kumar. Nano and microparticles as drug delivery device, Journal of pharmaceutics, 2000, 234-258.
- [3] O.KHoukhi, Modification physico-chimique de matrices polymériques par les procédés de microencapsulation pour la libération contrôlée du piroxicam, 2018, Université Djillali Liabes, Sidi Bel Abbès.
- [4] B.Cunha, C.Sibley, A.Ristucci. Doxycycline. Ther Drug Monit, 1982, 115-35.
- [5] S,Benyahia, A.Abdallah Bouamrane, Encapsulation de la doxycycline et l'asperine : Etude de l'effet des paramètres physicochimiques de préparation sur la stabilité des microcapsules d'alginat,2017, Université Djilali Bounaama, khemis miliana.
- [6] I.Tlili, thèse de doctorat : Développement analytique et suivi dans l'environnement des traces des antibiotiques à usage humain et vétérinaire, 2016, Université de Cartage.
- [7] M.Castro, T.Santos, J.Gerlach, Matrix metalloproteinases: Targets for doxycycline to prevent the vascular alterations of hypertension, Pharmacological Research, 2011, 567–572.
- [8] J.Boyle, E. McDermott, M.Crowther, A.Wills, P.Bell,M. Thompson. Doxycycline inhibits elastin degradation and reduces metalloproteinase activity in a model of aneurismal disease, J. Vasc. Surg.1998, 354–361.
- [9] F.Fernández, M.Folgueras, Cabrera, S., & López-Otín, C. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2010, 3–19.
- [10] A.Solomon, M. Rosenblatt, D.Li, Z.Liu, D.Monroy, Z.Ji, B.Lokeshwar, S.Pflugfelder. Doxycycline inhibition of interleukin-1 in the corneal epithelium. Investig. Ophthalmol, 2000, 2544–2557.
- [11] J.Groß, O.Yazdi, A.Thomas, C.Masin, M.Heinz, L.Guarda, G.Tschopp. Inflammasome Activators Induce Interleukin-1 α Secretion via Distinct Pathways with Differential Requirement for the Protease Function of Caspase-1. Immunity, 2012, 388–400.
- [12] S.Milano, F. Arcoleo, P. D'Agostino, E. Cillari. Intraperitoneal injection of tetracyclines protects mice from lethal endotoxemia downregulating inducible nitric oxide synthase in various organs and cytokine and nitrate secretion in blood. Antimicrob. Agents Chemother. 1997, 117–121.
- [13] A.Solomon, M. Rosenblatt, Q. Li, Z. Liu, D. Monroy, Z. Ji, B.Lokeshwar, S.Pflugfelder. Doxycycline inhibition of interleukin-1 in the corneal epithelium. Investig. Ophthalmol, 2000, 2544–2557

- [14] M. Archambaud, Les antibiotiques, Laboratoire Bactériologie-Hygiène, Mars 2009, CHU Rangueil, Toulouse.
- [15] I. Chopra, M. Roberts, Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbial Mol Biol Rev.* 2001.
- [16] T.Coustès, thèse de doctorat. Loi d'avenir agricole, réglementation du médicament vétérinaire et lutte contre l'antibiorésistance, 2016, Ecole national vétérinaire d'Alfort, France.
- [17] C.Chukwudi, rRNA Binding Sites and the Molecular Mechanism of Action of the Tetracycline. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 4433-41.
- [18] S.Saivin, G.Houin, Clinical pharmacokinetics of doxycycline and minocycline. *Clin Pharmacokinet*, 1988, 355-66.
- [19] FP.Meyer, H.Specht, B.Quednow, H.Walther. Influence of milk on the bioavailability of doxycycline – new aspects. *Infection*, 1989, 245-6.
- [20] KM.Deppermann, H.Lode, G.Höffken, G.Tschink, C.Kalz, P.Koepe. Influence of ranitidine, pirenzepine, and aluminium magnesium hydroxide on the bioavailability of various antibiotics, including amoxicillin, cephalexin, doxycycline, and amoxicillin-clavulanic acid. *Antimicrob Agents Chemother* .1989, 1901-7.
- [21] H.Nelis, A.DeLeenheer. Liquid chromatographic estimation of doxycycline in human tissues. *Clin Chim Acta* ,1980; 103: 209-17.
- [22] H.Maibach. Second-generation tetracyclines, a dermatologic overview: clinical uses and pharmacology. *Curtis*, 1991, 411-7.
- [23] P.Humbert, P.Treffel, JF.Chapuis, S.Buchet, C.Derancourt, P.Agache, The tetracyclines in dermatology. *J Am Acad Dermatol*, 1991, 691-7.
- [24] Y.Caraco, A.Rubinow. Enhanced anticoagulant effect of coumarin derivatives induced by doxycycline coadministration. *Ann Pharmacother*, 1992, 1084-6.
- [25] FL.Lanza. Esophageal ulceration produced by doxycycline: review of the literature and comparison of the injury from doxycycline hyclate and hydrochloride with that from doxycycline monohydrate. *Curr Ther Res*, 1988, 475-84.
- [26] D.Rabar, P.Combemale, F.Peyron. Doxycycline-induced photo-onycholysis. *J Travel Med*, 2004; 386-7.
- [27] N.Tsankov, D.Antonov, I.Grozdev. Doxycycline : réponse à Jean-Marie Bonnetblanc. *Ann Dermatol Venereol*, 2003, 789-130
- [28] SA.Ragland, A.Criss. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog.* 2017.

- [29] M. Laurent HEBERT. Thèse de doctorat, Etude de la résistance au lysozyme chez *Enterococcus faecalis*, 2006, Université de CAEN/BASSE-NORMANDIE.
- [30] I.Eric, S.Akomola, Extraction du lysozyme du blanc d'œuf de poule et mise en évidence de son activité antibactérienne sur : *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, 2015, Université 8 mai 1945, Guelma.
- [31] Wang Q. et al. « A novel Ctype lysozyme from *Mytilus galloprovincialis*: insight into innate immunity and molecular evolution of invertebrate C-type lysozymes ». *PLoS One*, 2013, 8-6.
- [32] A.Fleming, remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc.Roy.Soc. (London)*, 1992,306-317.
- [33] C.Blake, DF.Koenig, Mair GA, North AC, Phillips DC, Sarma VR. Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature*.1965 May 22, 757-61.
- [34] T.Bugg, *An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, 1997, Blackwell Science Ltd, Oxford.
- [35] J.Richardson. Early ribbon drawings of proteins. *Nat Struct Biol*. 2000 Aug, 624-5.
- [36] R.Enugala, M.Pires, M.Marques. Synthesis of the NAG–NAM disaccharide via a versatile intermediate. *Carbohydrate Research*, 2014, 112–118.
- [37] SA.Ragland, A.Criss. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog*, 2017 Sep, 21-13
- [38] J.Callewaert, C.Michiels. « Lysozymes in the animal kingdom ». *J Biosci*. 2010 Mar, 127-60.
- [39] Davies, R.C. *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 305-294.
- [40] Canfield, R.E., *J. Biol. Chem*, 1963, 2698-2707
- [41] Wetter, L.R. *J. Biol. Chem.*, 1951, 237-242.
- [42] A.Kerdudo, Thèse de doctorat. Optimisation de la conservation des cosmétiques: impact de la formulation, recherche des nouveaux conservateurs naturels encapsulation, 2014, Nice.
- [43] K.Chia, H.Been. Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system. *Process Biochemistry*.2006, 257-263.
- [44] H.Duan, Q.Niu, J.Wang, S.Ma, J.Zhang, Z.Zhang, High uptake carboxyl-functionalized porous β -cyclodextrin polymer for selective extraction of lysozyme from egg white. *Journal of Chromatography A*, 2019, 80-80.

- [45] M.Yakup, B.Gulay , Purification of lysozyme from egg white by Reactive Blue 4 and Reactive Red 120 dye-ligands immobilised composite membranes. *Process Biochemistry*, 2005, 1433-1442.
- [46] M.Zahaf. Formulation des microcapsules à libération prolongée à base de principe actif très peu soluble ou insoluble et caractérisation biopharmaceutique, 2014, Université Blida 1.
- [47] P.Morançais, Thèse de doctorat, Etude de la formation des émulsions dans des mélangeurs statiques. Application aux procédés de microencapsulation par polymérisation interfaciale, 1997, Université de Nantes.
- [48] J.Bile, thèse de doctorat. Micro encapsulation d'agent antimicrobien pour le développement de Conditionnements primaires fonctionnalisés, 2015, L'université clude bernard, France.
- [49] A.EL AYARI, thèse de doctorat. Les systèmes de délivrance des médicaments au niveau cutané, 2014, Université Mohammed V, Rabat.
- [50] I.BOUKHOUYA, thèse de doctorat. Elaboration de microparticules chargées d'Amoxicilline et de Théophylline à partir de polymères biodégradables : Etude cinétique de leur libération libération, 2019, Université Djillali Liabes , Sidi Bel Abbes.
- [51] N.Venkata J.Naga. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*, 2010,187–197.
- [52] S.Giraud, thèse de doctorat. Microencapsulation d'un diisocyanate et d'un phosphate d'ammonium application : élaboration d'un système polyuréthane monocomposant à propriété retardatrice de flamme pour l'enduction textile, 2002, Université des sciences et technologies de Lille.
- [53] K.Soltani, Développement de nouveaux systèmes à base de polymères biodégradables pour la libération prolongée d'anti-inflammatoires : cas de l'amidon de l'acide niflumique, 2011, Université Ferhat Abbas, Sétif.
- [54] R. Khar , S.Vyas,"diffusion contrôlée de médicament", 2002, 1-50.
- [55] I.Allout, N.Mesnadi. Contribution à l'étude de la synergie dans l'action antibactérienne de l'oxytetracycline et le lysozyme a l'état capsules, 2019, Université Saad Dahlab de Blida1.
- [56] L. Zorzim, M. Cocchietto , D. Voinovich, A. Marcuzzi, J. Filipovic-Grcic, G. Crembiale, C. Casarsa, R. Bulla, G. Sava , Lysozyme-containing chitosan-coated alginate microspheres for oral immunization, 2006, 420-413.
- [57] M.Ali, X. Frank Walboomers, A. Jansen, F.Yang , Influence of formulation parameters on encapsulation of doxycycline in PLGA microspheres prepared by double emulsion technique for the treatment of periodontitis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2019, 271-263.

- [58] J.wang, L.Helder, J.Shao, J.Jansen, M.Yang, F.Yang. Encapsulation and release of doxycycline from electrospray-generated PLGAmicrospheres: Effect of polymer end groups. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 564.1-9.