

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES FONDAMENTALES - SANTÉ N°619

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : Chimie - Pharmacotechnie

Présentée et soutenue publiquement par

KISTNER JULIEN

Le 8 décembre 2021

**Microencapsulation par transacylation en émulsion à partir de polymères
d'origine naturelle : phénomènes physicochimiques et optimisation**

Thèse dirigée par **EDWARDS-LEVY FLORENCE**

JURY

Mme Odile CHAMBIN, Professeure, Université de Bourgogne	Présidente
M Stéphane DESOBRY, Professeur, Université de Lorraine	Rapporteur
M Vincent FAIVRE, MCU, Université de Paris-Saclay	Rapporteur
M Christophe BLIARD, Chargé de recherche-HDR, CNRS	Examineur
Mme Florence EDWARDS-LEVY, Professeure, URCA	Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier Vincent FAIVRE, maître de conférences à l'université de Paris-Saclay ainsi que Stéphane DESOBRY, professeur à l'université de Lorraine, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mon travail en tant que rapporteurs.

Je souhaite adresser mes remerciements à Odile CHAMBIN, professeure à l'université de Bourgogne et à Christophe BLIARD, chargé de recherche – HDR au CNRS, pour avoir accepté d'examiner mon travail en participant à mon jury de thèse.

Je souhaite exprimer mes plus profonds remerciements à ma directrice de thèse, Florence EDWARDS-LEVY, professeure à l'université de Reims-Champagne Ardenne pour m'avoir encadré pendant ces trois années. Je la remercie de m'avoir apporté son soutien, ses conseils scientifiques et ses connaissances lorsque cela était nécessaire mais aussi de m'avoir laissé une grande autonomie dans mon travail. Merci Florence pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir épaulé dans le travail de laboratoire et de rédaction.

Je remercie Jean-Hugues RENAULT, directeur de l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR), pour m'avoir accepté au sein de sa structure et pour avoir soutenu mon projet de thèse.

Je remercie également Xavier COQUERET, professeur émérite à l'URCA ainsi que Christophe BLIARD, chargé de recherche – HDR au CNRS de m'avoir accepté au sein du groupe Polymères Fonctionnels et Réseaux (PFR) mais également pour leurs conseils scientifiques avisés.

Je tiens à remercier Marie-Christine ANDRY et Maïté CALLEWAERT pour leur accueil au sein du laboratoire de pharmacie galénique, pour leur bonne humeur, pour leur générosité, pour les moments de convivialité partagés et pour les (parfois longues) discussions scientifiques ou non que l'on a échangées.

Je souhaite apporter ma gratitude aux différentes personnes qui ont directement contribué à ce travail de thèse. En premier lieu, Elodie MILLART, ATER au sein du laboratoire pour les manipulations qu'elle a effectuées mais également pour sa bonne humeur et sa gentillesse (et ses gâteaux !). En deuxième lieu, Arianna RINALDI et Gwladys NGUEGUEP, stagiaires

ERASMUS, pour les expériences réalisées au laboratoire et pour les différents échanges culturels. Merci à toutes les trois pour les nombreux résultats que vous avez fournis.

Je remercie chaleureusement Charles-Emmanuel CARTERET, Charly, sans qui ces trois années auraient semblé bien plus longues. Merci pour les moments de détente, d'échange, de rire et de gourmandises, pour avoir apporté de la bonne humeur dans le bureau. Bon courage pour tes dernières années sans moi !

Plus généralement, je remercie tout le personnel de l'ICMR pour les différents échanges lors de séminaires, pour les différentes mesures réalisées ou tout simplement pour les quelques moments passés ensemble.

Un remerciement particulier va à Valérie PIRAUBE pour son suivi sans faille des doctorants, pour son soutien et sa disponibilité malgré les difficultés.

Enfin, je remercie tous mes proches, famille et amis qui ont été présents qui m'ont soutenu durant ce périple. En particulier mes parents pour leur soutien depuis bien longtemps, leur amour inconditionnel et leurs bons conseils, je n'en serai pas là aujourd'hui sans eux. Un immense merci également à Elsa, pour son soutien au quotidien, sa présence dans les bons comme les mauvais moments, pour son amour, sa bonne humeur et pour tout le reste. Merci pour tout !

Résumé

La microencapsulation consiste à emprisonner une substance au sein d'une particule de taille micrométrique, dans le but de la préserver de l'environnement extérieur, de protéger l'utilisateur contre une substance agressive, ou encore de contrôler la libération de la molécule encapsulée. Au laboratoire, une méthode originale d'encapsulation par transacylation en émulsion entre l'alginate de propylène-glycol (PGA) et une protéine a été mise au point. Cette méthode est basée sur la création de liaisons amides entre les fonctions amines libres de la protéine et les groupes esters du PGA dans une phase aqueuse émulsionnée (E/H) après alcalinisation sans utiliser d'agent réticulant classique. Les microparticules obtenues sont stables, biocompatibles, biodégradable et potentiellement intéressantes pour la délivrance de substances actives en thérapeutique ou en cosmétique.

Le premier objectif de ce travail est d'étudier la séparation de phase liquide-liquide induite par la présence des deux polymères au sein de la phase aqueuse. Cette séparation de phase est le résultat de différentes interactions entre les polymères. Le but est de comprendre l'influence de cette séparation de phase sur la faisabilité et les propriétés des microparticules. Pour cela, un sel est ajouté dans la phase aqueuse pour diminuer les interactions électrostatiques et donc la séparation de phases. Plusieurs sels de nature différente sont utilisés et comparés. La séparation de phase est bien affectée, jouant à son tour sur la faisabilité ainsi que les propriétés des particules.

Le second objectif de cette thèse est d'optimiser le procédé et la formulation pour la production de particules. Beaucoup de paramètres sont pris en compte et modifiés de manière à obtenir une formulation optimale. Dans un deuxième temps, les plans d'expériences sont utilisés pour apporter une démarche efficace en termes de nombre de manipulations et compléter la première approche.

Enfin, le dernier objectif est de remplacer le PGA par une pectine de betterave modifiée chimiquement dans le but d'améliorer le rendement. Cette démarche s'inscrit dans une volonté de valorisation des ressources locales.

Mots clés : Microencapsulation, polysaccharide, protéine, interface, transacylation

Abstract

Microencapsulation is a process by which substances are trapped into micrometric particles, in order to isolate and protect the encapsulated molecules from the external environment, to protect the user from aggressive constituents, as well as to control the release profile of the encapsulated substances. In our laboratory, an original method of microencapsulation was developed, based on the use of a transacylation reaction, creating covalent bonds between proteins and propylene glycol alginate (PGA). The covalent bonds are created after alkalization of the aqueous phase of a W/O emulsion, without using bifunctional crosslinking reagent. The resulting microparticles, which are stable, biocompatible, and biodegradable, have potential applications for the delivery of active compounds for therapeutics or cosmetics.

The first objective of this work was to study the liquid-liquid phase separation induced by both biopolymers in the aqueous phase. This phase separation is the result of several interactions between the polymers. The aim was to understand the influence of this phase separation on the feasibility and the properties of the microparticles. For this purpose, salt was added to the aqueous phase in order to diminish the electrostatic interactions and hence the phase separation. Several salts of different nature were used and compared. The phase separation was affected and the feasibility and the properties of the particles as well.

The second goal of this thesis was to optimize the process and the formulation to produce microparticles. Several parameters were assessed and adjusted in order to obtain the best formulation. In a second attempt, design of experiment (DOE) was used to bring an efficient way of organizing experiments and to complete the previous approach.

Finally, the last objective was to substitute the PGA by a modified beet pectin in order to improve the yield, with the objective of valorizing local resources.

Keywords : Microencapsulation, polysaccharide, protein, interface, transacylation

Table des matières

Remerciements	2
Résumé.....	4
Abstract	5
Table des matières	6
Liste des figures.....	13
Liste des tableaux.....	18
Abréviations.....	19
Introduction générale.....	20
Chapitre 1 : Etat de l'art.....	22
<i>A. Polymères de l'étude</i>	22
1. Les protéines	22
1.1. La sérumalbumine humaine.....	22
2. Les polysaccharides	27
2.1. Les alginates	27
2.2. Les pectines	35
<i>B. Interactions protéines-polysaccharides.....</i>	46
1. Introduction.....	46
2. Nature des interactions entre protéine et polysaccharide.....	47
2.1. Les interactions électrostatiques	47
2.2. Les interactions d'exclusion stérique	47

2.3.	Les interactions hydrophobes	48
2.4.	Les liaisons hydrogènes	48
3.	Séparations de phases de polymères en solution aqueuse	48
3.1.	Diagrammes de phase (121)	48
3.2.	Interactions attractives	50
3.3.	Interactions répulsives	51
4.	Mélange de protéines et de polysaccharides à l'interface	53
4.1.	Protéines à l'interface	53
4.2.	Polysaccharides à l'interface	54
4.3.	Mélanges protéine – polysaccharide	55
C.	Série de Hofmeister	59
1.	Introduction.....	59
2.	Effets sur la structure de l'eau	60
3.	Approche thermodynamique.....	62
4.	Interactions entre ions et molécules.....	62
5.	Polarisabilité des ions.....	63
6.	Couple d'ions.....	64
7.	Approche de Jones-Dole	65
D.	Microencapsulation : techniques et utilisations	67
1.	Domaines d'utilisation.....	67
1.1.	Domaine pharmaceutique (171)	67
1.2.	Domaine agroalimentaire	68
1.3.	Domaine de l'agriculture.....	68
1.4.	Domaine cosmétique	68
2.	Structures et morphologies.....	69

3.	Les méthodes d'encapsulation.....	70
3.1.	Méthodes physiques	70
3.2.	Méthodes physico-chimiques	72
3.3.	Méthodes chimiques.....	74
3.4.	Méthodes de microencapsulation par transacylation	76
4.	Libération des substances encapsulées	86
4.1.	Libération par diffusion	87
4.2.	Libération par dissolution ou fusion	88
4.3.	Libération par gonflement	88
4.4.	Libération par érosion ou dégradation	89
4.5.	Libération par une force extérieure	90
E.	Plans d'expérience (225–228)	91
1.	Définitions et vocabulaire	91
1.1.	Vocabulaire.....	91
1.2.	Coordonnées centrées réduites	92
1.3.	Domaine expérimental et domaine d'étude.....	92
1.4.	Facteurs continus et facteurs discrets	94
2.	Mise en place d'un plan d'expériences.....	94
2.1.	Mise en place de l'expérimentation.....	94
2.2.	Analyse des résultats.....	95
2.3.	Bilan	95
3.	Les plans factoriels complets à deux niveaux	96
3.1.	Cas d'un plan à deux facteurs	96
3.2.	Généralisation pour k facteurs.....	101
4.	Optimisation et plan de Scheffé (229)	102

4.1. Modèle mathématique de Scheffé	102
4.2. Optimisation.....	104
Chapitre 2 : Influence de l'ajout de sels sur la fabrication de microparticules	107
<i>Introduction.....</i>	<i>107</i>
<i>A. Matériels et méthodes.....</i>	<i>109</i>
1. Matières premières	109
2. Préparation des solutions	109
3. Mesures de turbidité.....	110
4. Mesures de viscosités.....	110
5. Fabrication des particules	111
6. Mesures de tailles des particules	112
7. Observation des particules et morphologies	112
8. Mesures de tensions de surface.....	113
8.1. Description du tensiomètre à goutte	113
8.2. Calcul de la tension de surface.....	114
8.3. Réalisation de la mesure	116
9. Cinétiques de libération	116
10. Analyse élémentaire	117
<i>B. Résultats et discussion.....</i>	<i>117</i>
1. Effet de l'ajout de NaCl dans la phase aqueuse	117
1.1. Effets sur la turbidité des phases aqueuses.....	117
1.2. Effet sur la viscosité des phases aqueuses.....	122
1.3. Effet sur les propriétés interfaciales des polymères.....	124

1.4.	Influence sur la faisabilité des microparticules.....	126
1.5.	Influence sur la structure interne des particules	128
1.6.	Analyse élémentaire des particules pour différentes concentrations en NaCl	129
1.7.	Cinétiques de libération pour des particules avec différentes concentrations en NaCl	130
2.	Effet de l'ajout de KCl dans la fabrication de microparticules par transacylation en émulsion.....	131
2.1.	Influence sur la turbidité de la phase aqueuse	132
2.2.	Influence sur la faisabilité des microparticules.....	132
2.3.	Effet sur la structure interne des microparticules	133
3.	Effet de l'ajout d'autres sels monovalents dans la fabrication de microparticules	134
C.	Conclusions du chapitre	140
Chapitre 3 : Phase hydrophobe et optimisation		142
A.	Introduction	142
B.	Matériels et méthodes.....	143
1.	Matières premières.....	143
2.	Préparation des solutions	143
3.	Détermination de la HLB critique.....	144
C.	Résultats et discussion.....	144
1.	Relation entre HLB et microparticules	144
2.	Relation entre la nature des tensioactifs et la morphologie des microparticules.	146
3.	Détermination des valeurs de HLB critique	148
3.1.	Myristate d'isopropyle	149
3.2.	Huile de paraffine.....	151

4.	Optimisation.....	152
4.1.	Rendement.....	152
4.2.	Couple de tensioactifs.....	154
4.3.	Concentration en tensioactifs.....	156
4.4.	Vitesse d'agitation.....	157
D.	Conclusions du chapitre.....	158
Chapitre 4 : Plan d'expériences et optimisation		160
A.	Introduction	160
B.	Plan factoriel complet 2⁵.....	161
1.	Mise en place du plan	161
1.1.	Choix des paramètres.....	161
1.2.	Choix des réponses.....	164
2.	Résultats et discussion	167
2.1.	Plan complet.....	167
2.2.	Les demi-plans.....	171
C.	Plan d'optimisation de Scheffé	177
1.	Mise en place du plan d'expériences.....	178
2.	Résultats et discussion	179
2.1.	Analyse des effets des facteurs sur les réponses.....	179
2.2.	Optimisation et désirabilité.....	181
D.	Conclusions du chapitre.....	185
Chapitre 5 : Modification de la pectine de betterave pour la transacylation		187
A.	Introduction	187

B. Matériel et méthodes	188
1. Adaptation du protocole aux pectines.....	188
2. Déacétylation de la pectine de betterave	189
3. Caractérisation de la pectine déacétylée	189
C. Résultats et discussion.....	189
1. Caractérisation de la pectine de betterave déacétylée	189
1.1. RMN.....	190
1.2. Mesures de viscosités.....	192
1.3. Mesure de tensions de surface	193
2. Utilisation de la pectine déacétylée pour la fabrication de microparticules.....	195
3. Comparaison des rendements entre pectine naturelle et pectine déacétylée	197
4. Cinétiques de libération	198
5. Optimisation du protocole grâce à la pectine déacétylée	200
5.1. Utilisation du protocole standard à la place du protocole pectine	200
5.2. Réduction de la quantité de NaOH par rapport au protocole pectine	201
5.3. Diminution du temps de réaction par rapport au protocole pectine	201
D. Conclusions du chapitre	202
Conclusion générale	204
Bibliographie.....	207

Liste des figures

Figure 1 : Représentation de la structure tridimensionnelle de l'HSA. Chaque sous-domaine est représenté avec une couleur différente : Ia en jaune, Ib en vert, IIa en rouge, IIb en magenta, IIIa en bleu et IIIb en cyan (7).....	23
Figure 2 : Caractéristiques structurales de l'alginate : a) monomères de l'alginate, b) conformation de la chaîne, c) distribution des blocks (extraite de ref. 35).	28
Figure 3 : Modèle de la "boîte à œufs" (35).....	30
Figure 5 : Représentation schématique du procédé d'extraction de l'alginate à partir d'algues brunes (40).....	32
Figure 6 : Représentation schématique d'un diagramme de phase pour deux solutions.	50
Figure 7 : Interactions entre protéines et polysaccharides en solution (118).	52
Figure 8 : Schéma récapitulatif des interactions entre protéines et polysaccharides en solution (112).	59
Figure 9 : Classification de Hofmeister pour quelques ions (beaucoup d'autres ont été étudiés depuis) (236).....	60
Figure 10 : Entropie de l'eau proche d'un ion moins l'entropie de l'eau pure ($K^{-1}mol^{-1}$) en fonction du rayon des ions (Å). Des valeurs positives de $DSII$ (partie inférieure) indiquent que l'eau est plus mobile que dans le bulk. Des valeurs négatives (partie supérieure) indiquent que l'eau est moins mobile que dans le bulk. Les kosmotropes sont dans la partie supérieure alors que les chaotropes sont dans la partie inférieure (165).....	65
Figure 11 : Valeurs des coefficients de Jones-Dole pour les anions et les cations courants (165).	66
Figure 12 : Représentations des différents types de particules que l'on peut obtenir selon la méthode utilisée (169).....	69
Figure 13 : Représentation schématique du spray (167).	72
Figure 14 : Mécanisme de la réaction de transacylation.	78

Figure 15 : Protocole de préparation de microparticules par transacylation en émulsion.....	82
Figure 16 : Particules obtenues par transacylation en émulsion.....	83
Figure 17 : Protocole mixte de formation de microsphère de gal à membrane.	84
Figure 18 : Coupes de microsphères de gel à membrane Alginate-sérumalbumine humaine observées au microscope optique (cliché du laboratoire).	85
Figure 19 : Protocole de préparation des billes de gel à membrane PGA-protéine en milieu aqueux.....	86
Figure 20 : Particules obtenues par transacylation par la méthode mixte.....	86
<i>Figure 21 : Représentation géométrique d'un plan d'expériences à deux facteurs.</i>	<i>93</i>
<i>Figure 22 : Placement des points expérimentaux et notations.</i>	<i>97</i>
Figure 23 : Exemples de représentations de Scheffé. A gauche : 3 composants et modèle cubique complet. A droite : 4 composants et modèle quadratique. Les points bleus représentent les points expérimentaux et les croix les points tests.	103
<i>Figure 24 : Exemple d'un domaine expérimental à trois composants tronqué.....</i>	<i>104</i>
Figure 25 : Illustrations des différents profils de désirabilité.	105
Figure 26 : Séparation de phase liquide-liquide observée pour les phases aqueuses pour différentes concentrations en polymères.....	108
<i>Figure 27 : Schéma représentant le procédé de fabrication des microparticules par transacylation en émulsion.</i>	<i>111</i>
<i>Figure 28 : Schéma représentant le système de mesure de tensiométrie à goutte pendante (257).</i>	<i>113</i>
<i>Figure 29 : Représentation schématique d'une goutte formée à la sortie d'une aiguille (258).</i>	<i>115</i>
<i>Figure 30 : Turbidités des solutions de polymères en fonction de la concentration en NaCl.</i>	<i>119</i>
Figure 31 : Turbidités des phases aqueuses en fonction des concentrations en polymères.	121
<i>Figure 32 : Photographies des phases aqueuses au microscope en fonction de la concentration en NaCl (HSA 3% - PGA 1,5%)</i>	<i>121</i>

Figure 33 : Viscosités des phases aqueuses en présence de NaCl lors d'un cycle de vitesses de cisaillement.	123
Figure 34 : Viscosités des solutions de polymères en fonction de la concentration en NaCl.	123
<i>Figure 35 : Tension interfaciale entre la phase aqueuse et le myristate d'isopropyle en fonction de la concentration en NaCl.</i>	<i>124</i>
Figure 36 : Tensions interfaciales entre le myristate d'isopropyle et différentes phases aqueuses.....	125
<i>Figure 37 : Elasticités et viscosités de l'interface pour différentes solutions de polymères en fonction de la concentration en NaCl.</i>	<i>126</i>
<i>Figure 38 : Coupes de particules obtenues pour différentes concentrations en polymères. En vert, la partie où des particules peuvent être obtenues sans l'ajout de NaCl (résultats I. HADEF). En orange, partie où l'ajout de NaCl est nécessaire à l'obtention de particules (nouveaux résultats).....</i>	<i>127</i>
<i>Figure 39 : Comparaison des particules et de leurs coupes pour différentes concentrations en NaCl. Cas en-dessous de la limite habituelle de faisabilité (HSA 1,5% - PGA 3%).....</i>	<i>128</i>
<i>Figure 40 : Comparaison des particules et de leurs coupes pour différentes concentrations en NaCl. Cas au-dessus de la limite habituelle de faisabilité (HSA 20% - PGA 3%).....</i>	<i>129</i>
Figure 41 : Cinétiques de libération pour des particules en présence de différentes concentrations en NaCl.	131
<i>Figure 42 : Particules obtenues pour différentes concentrations en KCl. Cas en-dessous de la limite de faisabilité (HSA 3% - PGA 1,5%).....</i>	<i>133</i>
<i>Figure 43 : Comparaison des particules obtenues avec NaCl et KCl (HSA 3% - PGA 1,5%)....</i>	<i>134</i>
Figure 44 : Turbidités des phases aqueuses pour différentes concentrations en sels monovalents.....	135
<i>Figure 45 : Comparaisons de particules et leurs coupes pour les différents sels monovalents.</i>	<i>136</i>
Figure 46 : Coefficients de Jones-Dole des ions usuels.....	138

Figure 47 : Corrélation entre la turbidité des solutions et le coefficient de Jones-Dole des chlorures (HSA 3% - PGA 1,5% - 400mM).	Erreur ! Signet non défini.
Figure 48 : Particules obtenues pour différentes valeurs de HLB.....	145
Figure 49 : Diamètres moyens et indices de polydispersité pour les particules obtenues avec différentes valeurs de HLB.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 50 : Particules et coupes de particules pour différentes valeurs de HLB et différents couples de tensioactifs.....	147
Figure 51 : Etat des émulsions après centrifugation en fonction de la valeur de HLB pour le myristate d'isopropyle.	150
Figure 52 : Hauteur de l'émulsion restante (cm) après centrifugation en fonction de la valeur de HLB pour le myristate d'isopropyle en présence d'HSA.	151
Figure 53 : Hauteur de l'émulsion restante après centrifugation pour l'huile de paraffine..	152
Figure 54 : Particules et coupes de particules pour différents couples de tensioactifs à la même valeur de HLB (4,6).	155
Figure 55 : Particules obtenues pour différentes concentrations en tensioactif. HSA 10% - PGA 3%.	156
Figure 56 : Particules obtenues en fonction de la vitesse d'agitation. HSA 10% - PGA 3%. HLB 4,6 et 4% de tensioactifs.	157
Figure 57 : Matrice complète du plan 2 ⁵	166
Figure 58 : Effets des facteurs pour chaque réponse dans le cas du plan factoriel complet.	168
Figure 59 : Clichés des particules obtenues avec le plan d'expériences.....	169
Figure 60 : Interactions entre les facteurs pour le plan complet. "123" signifie l'interaction entre le facteur 1, le facteur 2 et le facteur 3.	171
Figure 61 : Effets des facteurs pour le demi-plan du myristate d'isopropyle.....	173
<i>Figure 62 : Interactions entre les facteurs pour le demi-plan du myristate d'isopropyle.</i>	<i>174</i>
Figure 63 : Effets des facteurs pour le demi-plan de l'huile de paraffine.....	175
<i>Figure 64 : Interactions entre les facteurs pour le demi-plan de l'huile de paraffine.</i>	<i>176</i>

<i>Figure 65 : Résultats sous forme graphique du plan de Scheffé. (Des versions plus grandes pour plus de netteté sont disponibles en annexes).....</i>	180
<i>Figure 66 : Désirabilités pour chaque réponse du plan de Scheffé.</i>	181
<i>Figure 67 : Surface de réponse de la désirabilité pour le plan de Scheffé.....</i>	182
Figure 68 : A gauche : particules obtenues au point de désirabilité maximum. A droite : particules obtenues pour le point inférieur droit du triangle contenant le domaine d'étude.	184
Figure 69 : En haut, spectre RMN du proton pour la pectine de betterave déacétylée. En bas, spectre RMN du proton de la pectine de betterave naturelle.	191
<i>Figure 70 : Viscosités des phases aqueuses en fonction de leur composition.....</i>	192
<i>Figure 71 : Viscosités des phases aqueuses lors d'un cycle de gradient de tension de cisaillement.....</i>	193
Figure 72 : Tensions de surface pour différentes phases aqueuses en fonction de leur composition.....	194
<i>Figure 73 : Réactions de transacylation possibles. En bleu, celle qui est souhaitée pour établir le réseau. En jaune, la réaction parasite.</i>	197
Figure 74 : Cinétiques de libération du lysozyme pour des particules à partir de pectine naturelle et de pectine déacétylée.	199

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Conditions opératoires pour les différentes fractions dans la méthode de Cohn (22)</i>	26
<i>Tableau 2 : Matrice des essais à réaliser.</i>	98
<i>Tableau 3 : Représentation complète d'un plan d'expériences.</i>	100
Tableau 4 : Quantité de matière d'ester pour chaque composé. Quantité de matière de réactif ajouté. Le détail des calculs peut être trouvé en annexes.....	153
Tableau 5 : Rendements de la réaction de transacylation en fonction de la quantité de soude dans le milieu.	154
Tableau 6 : Matrice pour le plan de Scheffé.	178
<i>Tableau 7 : Comparatif des particules obtenues avec pectine naturelle et pectine déacétylée.</i>	196
<i>Tableau 8 : Récapitulatif des différents essais d'optimisation avec la pectine de betterave déacétylée.</i>	202

Abréviations

DE : Degré d'estérification

EtOH : Ethanol

HM : Hautement méthylée

HSA : Sérumalbumine humaine

LM : Faiblement méthylée

PBS : Tampon phosphate salin

PGA : Alginate de propylène glycol

PI : Indice de polydispersité

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Introduction générale

La microencapsulation est une technique répandue qui consiste à enfermer une substance dans une enveloppe ou une matrice. Les objets obtenus présentent des tailles allant du micromètre au millimètre et sont utilisés dans de nombreux domaines tels que la cosmétique, la pharmaceutique, l'agroalimentaire et certains domaines de l'industrie. Le but de l'encapsulation est de protéger les substances encapsulées en les protégeant du milieu extérieur mais elle permet également de contrôler leur libération.

Il existe de nombreuses méthodes d'encapsulation et cela permet d'adapter le procédé aux substances que l'on souhaite encapsuler. Les propriétés physicochimiques des substances encapsulées mais également leurs utilisations souhaitées vont régir le choix de la méthode la plus adaptée. Chacune des méthodes présente des avantages et des inconvénients qu'il est important de prendre en compte.

Au laboratoire, une méthode chimique d'encapsulation a été développée, basée sur une réaction de transacylation entre un polysaccharide estérifié et une protéine. Cette réaction de transacylation crée des liaisons covalentes, ce qui engendre des particules stables et résistantes à beaucoup de conditions environnementales. Cette méthode permet, par simple alcalinisation du milieu, d'initier la réaction de transacylation, il n'est donc pas nécessaire d'utiliser d'agents de réticulation toxiques. Cette particularité, couplée à l'origine naturelle des polymères, permet d'obtenir des particules biocompatibles et biodégradables, appropriées pour des utilisations dans les domaines de la pharmaceutique et de la cosmétique et autres applications biomédicales.

Bien que cette technique d'encapsulation ait été développée il y a plusieurs années, certains phénomènes physicochimiques impliqués dans le procédé ne sont pas encore élucidés. Le but de cette étude est de trouver une explication quant à l'implication et l'influence de ces phénomènes sur la faisabilité et sur les propriétés des particules. La thèse d'Imane HADEF (1) s'inscrit déjà dans cette démarche et plusieurs études de cette thèse sont fondées sur ses résultats.

Dans un premier chapitre, une étude bibliographique présente un état de l'art pour permettre de comprendre au mieux l'étude réalisée. Cela permet aussi de présenter les différents outils utilisés dans la partie expérimentale.

Le deuxième chapitre présente les résultats obtenus sur l'influence de la présence de sel dans la phase aqueuse contenant les deux polymères (sérumalbumine humaine (HSA) et alginate de propylène-glycol (PGA)). Les résultats de ce chapitre permettent de mieux comprendre les interactions entre les deux polymères présents dans l'étude ainsi que leurs répercussions sur les particules obtenues et leurs propriétés.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude de la modification de la phase organique à des vues d'optimisation du protocole. La nature de la phase organique ainsi que celle des tensioactifs est modifiée de manière à trouver les conditions optimales d'émulsification.

De manière à poursuivre l'optimisation de procédé, les plans d'expériences ont été utilisés dans le chapitre 4 pour apporter une compréhension plus globale du système. Les plans d'expériences permettent de faire varier plusieurs paramètres de l'étude simultanément tout en optimisant le nombre de manipulations. Ce chapitre est découpé en deux parties distinctes : le plan de screening pour avoir une vue d'ensemble sur le procédé et le plan de Scheffé pour optimiser les paramètres retenus lors de la première étape.

Enfin, le dernier chapitre présente les essais réalisés en remplaçant le PGA par de la pectine de betterave dans la phase aqueuse. Cette pectine a été modifiée chimiquement de manière à en retirer les groupements acétates pour éviter les réactions parasites. Cette pectine modifiée est également caractérisée pour étudier l'influence des groupements acétates sur ses propriétés.

Chapitre 1 : Etat de l'art

A. Polymères de l'étude

Dans cette étude, deux familles principales de polymères ont été utilisées : les protéines et les polysaccharides. La famille des protéines est représentée par la sérumalbumine humaine (HSA) tandis que la famille des polysaccharides est représentée par les alginates et les pectines. Ces deux familles de polymères constituent les ingrédients de base pour la fabrication de particules par transacylation. En effet, c'est entre le groupement ester du polysaccharide et le groupement amine de la protéine que va se former une liaison covalente. Il est donc important de bien connaître ces polymères dans ce cadre. Les fonctionnalités de ces polymères ainsi que leurs propriétés et leur mode de fabrication seront discutés.

1. Les protéines

1.1. La sérumalbumine humaine

La sérumalbumine humaine (Human Serum Albumin, HSA) est une protéine naturellement présente dans le corps humain. Elle est la protéine la plus présente dans le sang. Cette protéine est synthétisée dans le foie et est le précurseur d'une autre protéine qui est la proalbumine (2). La sérumalbumine humaine a un poids moléculaire de 66.5 kDa et sa concentration sanguine est comprise entre 35 et 50 g/l (3). La sérumalbumine joue principalement un rôle de transporteur de composés dans le sang et participe à la pression osmotique du sang.

1.1.1. Structure

La séquence primaire de la sérumalbumine humaine a été identifiée pour la première fois en entier en 1975 (4). Il a fallu attendre 1989 pour que la structure tridimensionnelle soit résolue par Carter avec une résolution de 6 Å (5). La résolution de cette structure est ensuite petit à petit améliorée pour atteindre 2.8 Å en 1992 (6) et 2.5 Å en 1999 (7). D'après ces études, la

structure tridimensionnelle de l'HSA est composée en majorité de motifs hélices (67%) dans sa structure secondaire. Quelques coudes et boucles sont également présents. La forme de la protéine fait penser à celle d'un cœur, asymétrique avec des dimensions de 80 x 80 x 30 Å et un volume de 88.249 Å³.

La structure complète de l'HSA est composée de trois domaines de structures homologues d'hélices alpha. Le domaine I qui contient les résidus 1 à 195, le domaine II (résidus 196-383) et enfin le domaine III (résidus 384-585). Chacun de ces domaines est composé de 10 hélices antiparallèles et divisé en 2 sous-domaines. Ces deux sous-domaines sont composés de 6 et 4 hélices respectivement (sous-domaine A et sous-domaine B respectivement).

L'HSA contient également 35 acides aminés cystéines qui sont impliqués dans la formation de 17 ponts disulfures, ce qui permet de stabiliser la structure globulaire de la protéine. Cette structure globulaire qui organise les domaines dans une position bien particulière, confère des propriétés allostériques à l'HSA monomérique, ce qui lui permet de se lier facilement avec un

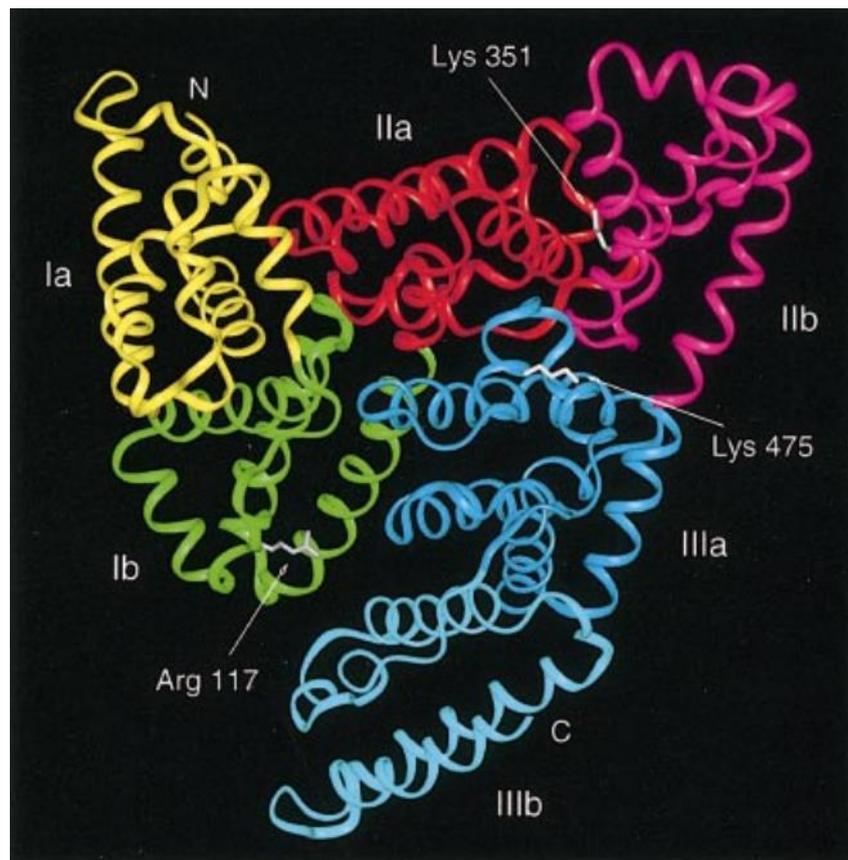


Figure 1 : Représentation de la structure tridimensionnelle de l'HSA. Chaque sous-domaine est représenté avec une couleur différente : Ia en jaune, Ib en vert, IIa en rouge, IIb en magenta, IIIa en bleu et IIIb en cyan (7).

grand nombre de ligands (8,9). D'autre part, la sérumalbumine humaine comporte en moyenne 58 groupements amines libres (1 groupement alpha apporté par un acide aspartique et 57 apportés par les lysines) (10).

1.1.2. Fonctions biologiques

La sérumalbumine humaine remplit un bon nombre de fonctions dans le métabolisme humain. Cela implique qu'une baisse de la concentration sanguine de cette protéine puisse être à l'origine de dysfonctionnements du métabolisme (11). L'HSA sert à réguler de nombreux phénomènes dans la physiologie humaine comme par exemple le potentiel redox ou la pression osmotique du plasma entre le sang et les tissus(12).

L'autre rôle important de l'HSA est le transport de molécules. Nous avons vu précédemment que l'HSA a de très grandes capacités de liaison ce qui fait qu'elle est adaptée pour ce rôle. En plus de très facilement se lier aux molécules (endogènes et exogènes), la protéine apporte également une protection contre les radicaux libres et autres réactifs aux molécules qu'elle transporte (13). La présence de nombreux acides aminés chargés dans le squelette de l'HSA lui permet d'avoir un rôle de tampon pour le plasma (14).

Les niveaux de sérumalbumine humaine dans le sang peuvent servir d'indicateur de pathologie et donc d'éléments de diagnostic (14). Par exemple, les patients atteints de gros traumatismes physiques tels que des infections, de graves blessures, dans le cas de maladies ou encore après une chirurgie, voient souvent leur taux d'albumine dans le sang diminuer. En effet, le corps faisant face au traumatisme, altère son comportement habituel et la synthèse de l'albumine n'est plus une priorité (15). Il existe pourtant une corrélation linéaire entre le taux d'albumine dans le sang et la mortalité des patients (16).

1.1.3. Glycation de la sérumalbumine

La sérumalbumine humaine, comme beaucoup de protéines, est sujette à la glycation non enzymatique par des sucres réducteurs. En effet dans le système sanguin, le glucose et ses dérivés sont très présents et peuvent réagir avec l'HSA pour former des produits stables (17). Les sucres se lient principalement avec les acides aminés Lys, Arg et Cys. Sur l'HSA, 29 sites de liaisons ont été identifiés dont 18 résidus Lys. A cause de sa longue demi-vie (environ 21 jours)

et de sa forte concentration sanguine, l'HSA est une des cibles principales de la glycation. Cette glycation a lieu par un procédé lent et non enzymatique. Une molécule de glucose s'attache à une amine libre de l'albumine pour former une base de Schiff réversible qui, par un réarrangement d'Amadori donne un résidu fructosamine stable. Ce produit d'Amadori peut ensuite se cycliser en pyranose ou furanose (18).

Lorsque les niveaux de sucre dans le sang sont élevés (comme dans les cas de diabète par exemple), la glycation de l'HSA peut vraiment prendre des proportions importantes et causer du tort au patient (19). Chez une personne sans pathologie particulière, le taux d'albumine glyquée se situe entre 1 et 10% de l'albumine totale. Dans le cadre de diabète ce taux peut atteindre les 30% et même arriver entre 40 et 50% dans certains cas spécifiques (20). Les modifications structurelles de l'HSA lors de la glycation entraînent un changement dans la capacité de liaison de l'HSA avec d'autres acides aminés (21).

1.1.4. Fabrication de L'HSA

L'albumine est la protéine la plus présente dans le plasma sanguin comme annoncé précédemment. Cependant, elle n'est pas la seule protéine présente. Il faut donc trouver un moyen pour la séparer des autres protéines et la purifier. Il y a deux possibilités pour extraire l'albumine du sang : soit partir du sang complet soit partir du plasma seul. Il est évident que partir du plasma seul permet de limiter le nombre d'étapes et est donc plus intéressant. C'est pour cela que les dons de plasma sont importants puisqu'ils sont la principale source de protéines sanguines pour la fabrication de médicaments.

Le fractionnement du plasma (toutes les étapes mises en œuvre pour précipiter les protéines) a été mis au point par E.J. Cohn en 1946 (22). La méthode porte aujourd'hui encore le nom de « méthode de Cohn ». Ce procédé optimisé lors de la seconde guerre mondiale puisque l'albumine était très utilisée pour les blessés de guerre. En effet, son utilisation permettait d'augmenter le volume sanguin des patients et ainsi favoriser leur guérison (23).

La méthode de Cohn, qui est suffisamment douce pour que l'albumine conserve ses capacités biologiques, repose sur plusieurs étapes de précipitation faisant intervenir des changements de pH, de température, de concentration en éthanol et de force ionique. A chaque étape, des protéines sont précipitées et retirées du plasma. Chaque étape donne ce qui est appelé une fraction. L'albumine se situe dans la cinquième et dernière fraction (22).

Tableau 1 : Conditions opératoires pour les différentes fractions dans la méthode de Cohn (22)

Numéro de fraction	Fraction I	Fraction II	Fraction III	Fraction IV	Fraction V
Ethanol (%)	8	25	18	40	40
pH	7.2	6.9	5.2	5.8	4.8
Température (°C)	-3	-5	-5	-5	-5

Ce procédé d'extraction repose sur les différences de solubilité des protéines. En effet, l'albumine est la protéine avec la meilleure solubilité, et avec le plus faible point isoélectrique, ce qui explique qu'elle soit la dernière à être extraite. Bien sûr, à chaque étape, une petite partie de l'albumine est perdue mais il existe des méthodes pour purifier les différentes fractions et ainsi limiter les pertes (reprécipitation, ou répétition des étapes d'extraction) (24).

D'autres méthodes d'extraction des protéines à partir du plasma sanguin ont vu le jour comme par exemple la séparation par chromatographie échangeuse d'ion (25) et par chromatographie d'affinité (26). Dans le cas de la chromatographie par affinité, un anticorps spécifique de l'HSA est fixé sur un gel. La protéine est ensuite mise en présence de ce gel et va se lier à l'anticorps spécifique. Il suffit ensuite de décrocher l'HSA. L'avantage du procédé par chromatographie est qu'il est facilement automatisable et que son coût est réduit. Il existe également des procédés mixtes qui combinent une extraction à l'éthanol qui est complétée par des purifications en chromatographie (27).

Devant l'importante demande d'HSA pour la fabrication de médicaments et la relativement faible source de plasma, des comportements frauduleux ont pu voir le jour comme par exemple, l'utilisation de sang périmé ou bien de l'extraction d'albumine à partir de placenta. (24). Des alternatives de production d'HSA ont alors été développées et de nouvelles sources d'albumine sont recherchées. Plusieurs exemples sont disponibles dans la littérature et on peut trouver des sources d'HSA telles que les bactéries (*Escherichia Coli* (28), *Saccharomyces cerevisiae* (29), *Pichia pastoris* (30)) ou bien des animaux ou plantes transgéniques (31,32).

2. Les polysaccharides

Les polysaccharides sont naturellement présents en grandes proportions dans la nature. Ils font partie des macromolécules les plus représentées avec les protéines, les acides aminés et les lipides. Les polysaccharides sont des biopolymères dont les monomères sont des unités monosaccharidiques soit de structure aldose (cycle à 6 atomes de type pyranose) soit de structure cétose (cycle à 5 atomes de type furanose). Le nombre d'unités monosaccharidiques dans un polysaccharide peut varier de 20 à plus de 60,000. Le lien entre les monomères au sein du polysaccharide est de nature covalente par le biais d'une liaison glycosidique. Les sources de polysaccharides dans la nature sont nombreuses telles que les plantes (cellulose, pectine), les animaux (acide hyaluronique, héparine), les algues (agar, alginate) ou encore les microorganismes. Leur structure peut être linéaire ou bien branchée, en brosse, en étoile...(33).

Les polysaccharides remplissent majoritairement deux rôles dans les organismes vivants. Leur première fonction est de servir comme matériau de construction pour les plantes en étant un des constituants majeurs des parois cellulaires. Le second rôle est un rôle de réserve de nourriture/énergie sous la forme d'amidon dans les plantes ou sous forme de glycogène chez les mammifères (34).

Deux catégories de polysaccharides vont nous intéresser pour cette étude, la famille des alginates ainsi que la famille des pectines.

2.1. Les alginates

Les alginates sont des polysaccharides complexes issus d'algues brunes de la famille des Phaeophyceae (35) ou bien de certaines bactéries et sont donc bien présents dans la nature. La production annuelle industrielle est d'environ 30000 tonnes, ce qui représente sûrement moins de 10% de la quantité de polymère que peuvent produire les algues naturellement. Les techniques de production industrielle sont principalement la culture d'algues et le procédé par fermentation, même si ce dernier n'est pas encore viable économiquement (36).

Les utilisations des alginates sont nombreuses et se rencontrent dans plusieurs domaines. On trouve leur présence dans le domaine médical en tant que traitement pour les plaies

chroniques (37) mais aussi comme matériau pour l'encapsulation de cellules dans des hydrogels, comme excipients pharmaceutiques ou encore comme additifs alimentaires (38).

2.1.1. Structure

Les alginates sont des polysaccharides branchés composés de deux unités monosaccharidiques qui sont l'acide β -D-mannuronique et l'acide α -L-guluronique, liés par des liaisons de type 1 \rightarrow 4. La structure est composée de blocs d'acide mannuronique et de blocs d'acide guluronique avec, entre les deux, des séquences mixtes. La composition, la séquence et le poids moléculaire de ce biopolymère peuvent varier en fonction de la source et de la sous espèce qui le produit (36).

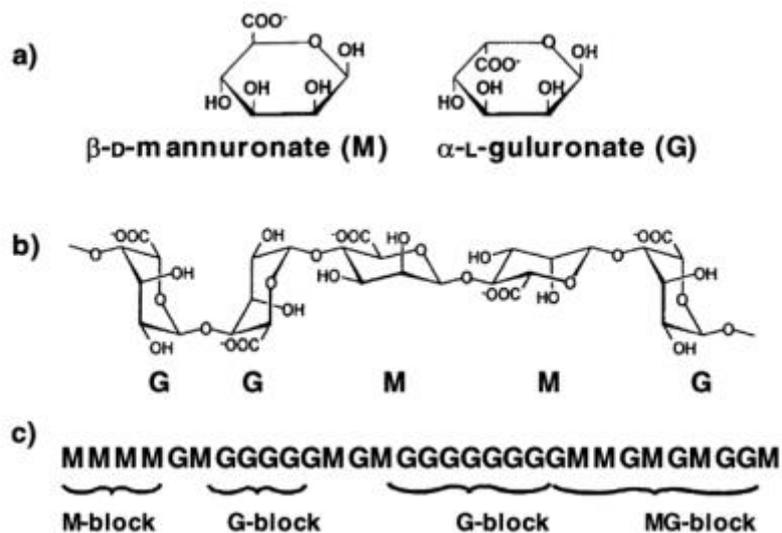


Figure 2 : Caractéristiques structurales de l'alginate : a) monomères de l'alginate, b) conformation de la chaîne, c) distribution des blocs (extraite de ref. 35).

Bien que la structure des alginates change en fonction de la source, il est possible de déterminer le ratio entre acide mannuronique et acide guluronique grâce à la RMN du proton. La RMN peut également apporter des informations sur la structure de la chaîne du polymère. En effet, il est possible, en considérant deux unités monosaccharidiques côte à côte, de déterminer les ratios des différents blocs en se concentrant sur le carbone anomère (39).

2.1.2. Propriétés physiques

Les alginates sont globalement bien solubles dans l'eau, néanmoins, plusieurs paramètres peuvent affecter cette solubilité. Trois facteurs sont d'une importance majeure et sont : le pH de la solution aqueuse, la force ionique et la présence d'ions qui peuvent initier la gélification. Pour que les alginates soient solubles dans l'eau, il faut que les groupements acides carboxyliques soient déprotonés et donc que le pH soit suffisamment haut. Un changement de force ionique dans le milieu peut entraîner un changement de comportement de la part du polysaccharide qui peut alors changer de conformation, de viscosité et donc de solubilité. Enfin, les alginates ont la propriété de gélifier en présence de certains cations divalents comme Ca^{2+} , Sr^{2+} ou Ba^{2+} . Il est donc nécessaire que le milieu de solubilisation de l'alginate en soit dépourvu (40).

En ce qui concerne la solubilité des alginates dans un solvant organique, ceux-ci n'y sont pas solubles à l'état naturel. Il est nécessaire de former un sel organosoluble, tel que l'alginate de tétrabutyl-ammonium pour pouvoir obtenir une solubilisation complète dans certains solvants tels que le DMF ou le DMSO (41). La solubilité des alginates va fortement dépendre de l'état de protonation des acides carboxyliques. Dans le cas où les acides carboxyliques sont protonés, la solubilité totale ne peut être obtenue dans aucun solvant, l'eau y compris (40).

Les alginates sont connus pour former des hydrogels en présence de cations divalents. Cette gélification est possible grâce majoritairement à l'interaction des blocs d'acide guluronique qui s'associent pour former des jonctions en présence des ions divalents. Les blocs mixtes (acide mannuronique et acide guluronique) participent également mais forment des liaisons plus faibles. La structure obtenue est aussi appelée structure « boîte à œufs » en raison de sa forme caractéristique (Figure 3) (42, 43, 47). L'affinité des alginates pour les différents ions divalents est connue ($\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Ba} > \text{Sr} > \text{Ca} > \text{Co}, \text{Ni}, \text{Zn}$, (45)) mais c'est le Ca^{2+} qui est utilisé le plus (exemple parlant dans la cuisine moléculaire pour fabriquer des billes d'alginate).

Il existe deux méthodes principales pour la formation de gels à partir d'alginate et d'ions calcium. La première méthode est basée sur la diffusion des ions à travers la solution d'alginate à partir d'un réservoir externe. La seconde méthode consiste à introduire le calcium dans la solution d'alginate mais de manière dissimulée. Grâce à un élément déclencheur (changement de pH, de solubilité), le calcium est libéré et la gélification peut avoir lieu. En

général, la technique par diffusion se fait en ajoutant goutte à goutte une solution d'alginate de sodium dans un bain de CaCl_2 . La seconde méthode utilise principalement un sel de calcium insoluble tel que le CaCO_3 . En changeant le pH, le sel devient soluble et sert de source de calcium (46,47).

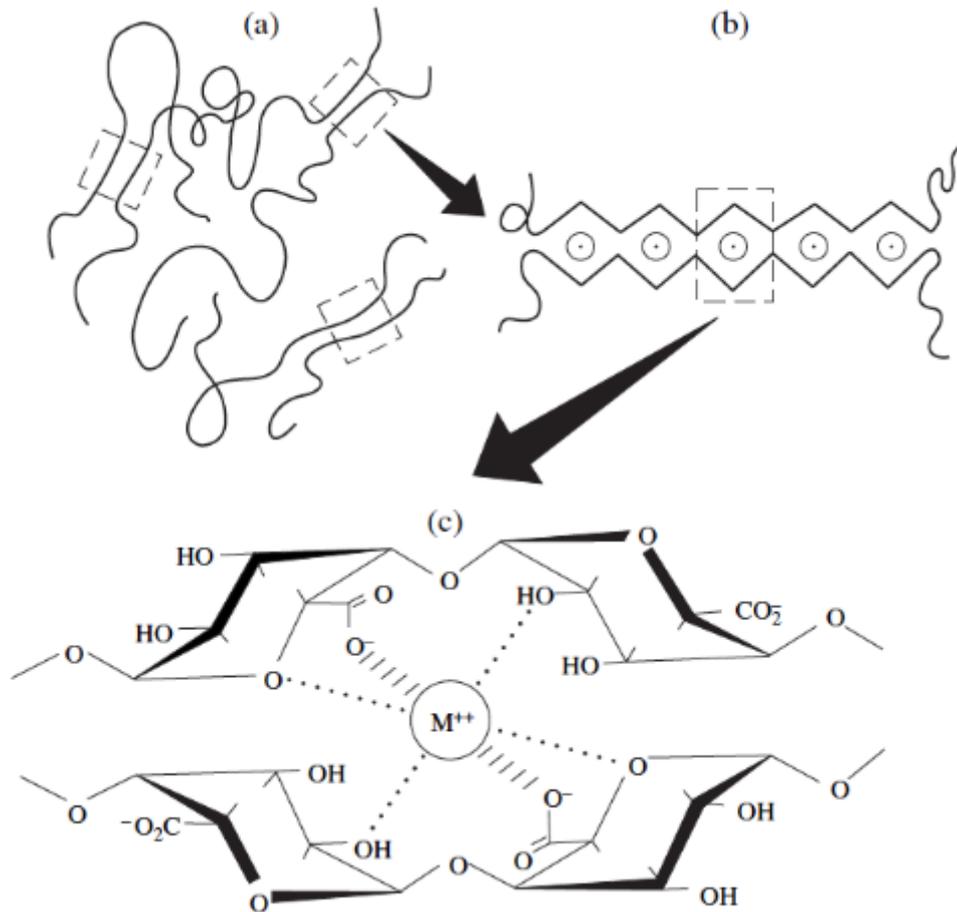


Figure 3 : Modèle de la "boîte à œufs" (35).

2.1.3. Propriétés chimiques

Sous des conditions acides, les polysaccharides peuvent subir une hydrolyse acide qui va couper les liaisons glycosidiques. Cette hydrolyse se déroule en trois étapes :

- Une protonation de l'atome d'oxygène de la liaison glycosidique pour donner le conjugué acide,
- Une hétérolyse du conjugué acide qui forme un groupe terminal non réducteur et un ion carbonium-oxonium,
- Une addition rapide d'eau sur l'ion carbonium-oxonium, formant un groupe réducteur.

Le mécanisme de cette hydrolyse a été décrit par Timell en 1963 (48).

L'alginate sous la forme de sel d'alginate de sodium en poudre sèche peut être conservé plusieurs mois sans dégradation dans un endroit froid, sec et à l'abri de la lumière du soleil. Cette durée de vie peut être augmentée à plusieurs années si la conservation se fait dans un congélateur. L'acide alginique se dégrade plus rapidement que le sel de sodium, la cause de cette dégradation plus rapide serait une catalyse intramoléculaire par un groupe carboxyle (40).

2.1.4. Production

Comme dit précédemment, l'alginate est extrait d'algues brunes et bien qu'une petite partie de la production mondiale se fasse par culture bactérienne, la très grande majorité provient de sources végétales. Ce seront donc les méthodes d'extraction à partir de l'algue qui seront présentées dans cette étude. La première étape de l'extraction consiste à retirer les contre-ions présents naturellement à l'aide d'un acide minéral tel que l'acide sulfurique. Pour la seconde étape, l'acide alginique insoluble obtenu est solubilisé par neutralisation avec un agent alcalin tel que du carbonate de sodium ou de l'hydroxyde de sodium pour former de l'alginate de sodium. Pour retirer les impuretés particulières entre autres, des étapes de traitement sont nécessaires : flottation, centrifugation, filtration, tamisage. L'alginate de sodium est alors précipité par de l'alcool, du chlorure de calcium ou un acide minéral. Le produit obtenu est ensuite séché et broyé (voir Figure 4)(35,40).

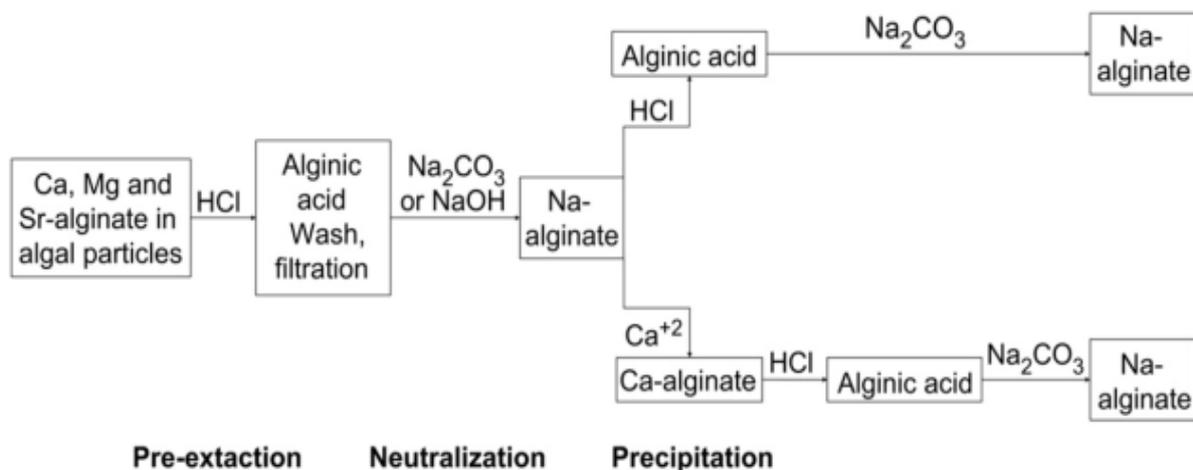


Figure 4 : Représentation schématique du procédé d'extraction de l'alginate à partir d'algues brunes (40).

L'alginate obtenu par cette méthode contient malheureusement des traces d'impuretés de types cytotoxiques et mitogènes, ce qui le rend impropre à l'utilisation dans le milieu biomédical. De manière à obtenir un produit pour ce genre d'applications, des méthodes plus rigoureuses d'extraction sont nécessaires et impliquent le plus souvent des étapes d'électrophorèse (49). Cette méthode n'est néanmoins pas adaptée pour des productions à grande échelle parce que trop coûteuse en temps et en matériel d'électrophorèse. Par conséquent une méthode d'extraction chimique a été mise au point ; celle-ci utilise des sels de Baryum-alginate. Les ions baryum ont une affinité pour l'alginate supérieure à celle du calcium. Les gels d'alginate à base de baryum sont donc beaucoup plus stables en conditions acides et neutres. Ainsi, les gels formés peuvent être élués avec différents agents et à l'éthanol. De cette manière, les impuretés sont retirées. Les gels d'alginate sont ensuite dissous dans des conditions alcalines fortes. Une dernière étape de dialyse est réalisée de manière à retirer les ions baryum et l'alginate de sodium est précipité par l'éthanol (50).

2.1.5. Modification de l'alginate

L'alginate possède plusieurs sites réactifs, ce qui permet facilement de modifier chimiquement ce dernier. La modification de l'alginate doit se faire en gardant en tête trois

paramètres importants qui vont plus ou moins dicter les stratégies de modification : la solubilité, la réactivité et la caractérisation.

En termes de solubilité, il est nécessaire de savoir dans quel type de solvant l'alginate doit être solubilisé : aqueux, organique ou bien mixte. Le type de solvant va dicter quels types de réactifs vont être utilisés pour réaliser les modifications. De plus, le degré de solubilisation souhaité va donner des indications sur le type de modifications à mettre en place. En ce qui concerne la réactivité, l'alginate possède trois sites réactifs principaux : les -OH en position secondaire (en C2 et C3) et le groupe -COOH (en C6). La différence de réactivité entre les deux groupements peut être utilisée facilement pour modifier sélectivement l'alginate. En revanche, la différence de réactivité entre les deux -OH est beaucoup plus faible et donc une différenciation est plus compliquée. De plus, il existe une différence de réactivité entre les monomères acides guluroniques et acides mannuroniques qui peut être exploitée. Enfin, en ce qui concerne la caractérisation des alginates, il est compliqué d'arriver à complètement en comprendre la structure et le mode de modification en raison de l'irrégularité de la structure. Pour comparer les modifications effectuées, il faudrait avoir à disposition plusieurs échantillons d'alginates de plusieurs structures différentes mais le marché n'est pas très fourni en termes de structures d'alginate contrôlées. Il existe néanmoins plusieurs réactions types qui sont couramment réalisées sur les alginates (40). On retrouve alors l'acétylation, la phosphorylation, la sulfatation et les modifications de nature hydrophobe entre autres.

Naturellement, l'alginate est un polysaccharide très hydrophile en raison des deux groupements hydroxyles sur chaque monomère ainsi que de la présence du propylène glycol. On peut désirer modifier l'alginate pour jouer sur son hydrophilie/hydrophobie, jusqu'à obtenir des molécules plus hydrophiles (ajout de groupements hydroxyalkyles), amphiphiles ou bien hydrophobes (ajout de groupements alkyles).

La méthode la plus directe pour effectuer ce genre de modifications est de lier de manière covalente une partie hydrophobe sur le squelette de l'alginate, comme par exemple de longues chaînes alkyles ou des groupements aromatiques. Par exemple, Hubert et al. ont modifié l'alginate en y greffant des chaînes polyéther courtes (51). Lorsque le squelette de l'alginate est habillé avec des groupements hydrophobes, deux types de forces apparaissent : des interactions répulsives entre les groupes carboxylates chargés, ce qui favorise l'extension de la chaîne, et des interactions attractives entre les groupements hydrophobes, ce qui

favorise l'effondrement de la chaîne sur elle-même. Le résultat de ces forces et la formation d'agrégats de haute masse moléculaire en solution lorsque les interactions hydrophobes dominent les interactions répulsives (52).

2.1.6. Utilisations

Depuis sa découverte en 1881, l'alginate a été largement utilisé dans l'industrie agro-alimentaire mais aussi dans les domaines cosmétique, pharmaceutique et dans l'industrie textile. En effet, il possède des propriétés émulsifiantes, stabilisantes, et épaississantes (53).

L'alginate est tellement utilisé dans l'industrie agro-alimentaire et a tellement d'applications différentes qu'il est considéré comme un des polysaccharides les plus polyvalents. Il est en général utilisé à des teneurs comprises entre 0,5 et 1,5% de la préparation finale (54). Les exemples d'utilisation dans l'industrie alimentaire sont les suivants (55) :

- Porteur d'ingrédients actifs (colorants, arômes, nutriments, épices ...),
- Fabrication de films ou de revêtements comestibles pour protéger les aliments,
- Utilisation dans les aliments solides pour éviter les pertes d'eau et la séparation de phase (56),
- Augmentation de la durée de vie des aliments en empêchant le développement de pathogène à la surface de la nourriture,
- Utilisation dans les crèmes glacées pour éviter la formation de cristaux de glace,
- Utilisation dans la bière pour stabiliser la mousse.

Dans l'industrie pharmaceutique, l'alginate est largement utilisé pour ses propriétés gélifiantes en présence d'ions divalents mais également en tant que polymère dans la mise en place de méthodes d'encapsulation (38).

2.1.7. L'alginate de propylène glycol

L'alginate de propylène glycol (PGA) est obtenu en faisant réagir l'alginate avec de l'oxyde de propylène à de fortes températures et pressions et à pH acide. On obtient alors différents degrés d'estérification et deux lieux d'estérification sont possibles : les groupes primaires 2-hydroxyprop-1-yl et les groupes secondaires 1-hydroxyprop-2-yl. Ces deux types d'esters sont présents en proportions respectant l'équilibre thermodynamique, les esters primaires étant favorisés thermodynamiquement et prédominants (ratio de 4 pour 1) (57). Obtenir une

estérification totale du PGA est très difficile voire impossible et en général, les produits commerciaux contiennent jusqu'à 10% de groupement acides libres et entre 10% et 30% de groupement neutralisés avec du sodium.

Lorsque le PGA est en milieu basique, une saponification a lieu et le groupement propylène glycol est libéré. Il est possible de récupérer l'alginate sous la forme d'alginate de sodium mais une réaction secondaire de type β -élimination a également lieu et la chaîne de l'alginate peut se trouver dégradée. Il est possible d'en récupérer une partie malgré tout mais le degré de polymérisation de la fraction récupérée sera moindre (ce qui peut entraîner des baisses de viscosité). Même si les conditions basiques ne sont maintenues qu'un court instant, de la saponification et de la dégradation peuvent avoir lieu.

2.2. Les pectines

Les pectines sont des polysaccharides naturels très présents dans les espèces végétales et principalement dans les parois de beaucoup de plantes. Ce polysaccharide est souvent trouvé avec d'autres composés tels que la cellulose, l'hémicellulose ou la lignine. Ces polysaccharides sont principalement constitués d'acide galacturonique avec des variations dans le poids moléculaire, la structure et la composition (58).

Les pectines sont principalement produites par les plantes pendant les étapes initiales de la croissance des cellules primaires et représentent environ un tiers de la matière sèche des plantes (familles des dicotylédones et monocotylédones) (59). Les pectines contribuent à la fermeté et à la structure des tissus des plantes et sont impliquées dans l'adhésion intercellulaire, la résistance mécanique de la paroi de la cellule et jouent un rôle important dans le développement de la plante (60).

2.2.1. Structure

La structure chimique et la composition exactes des pectines ne sont toujours pas complètement élucidées. En effet, ces molécules sont complexes et difficile à comprendre car leurs structures changent en fonction de la source et des conditions d'extraction, mais aussi en fonction de la localisation et d'autres facteurs environnementaux. Aussi, la structure des pectines peut changer pendant leur extraction, leur stockage, le degré de maturité de la source et la manipulation de la substance végétale initiale (61).

Cependant, la communauté scientifique est aujourd'hui d'accord pour dire que cette famille de molécule comporte est composée d'un polysaccharide hétérogène qui est constitué de 3 domaines principaux : un domaine homogalacturonane qui alterne avec deux régions de rhamnogalacturonane fortement branchées, nommées RG-I et RG-II (62).

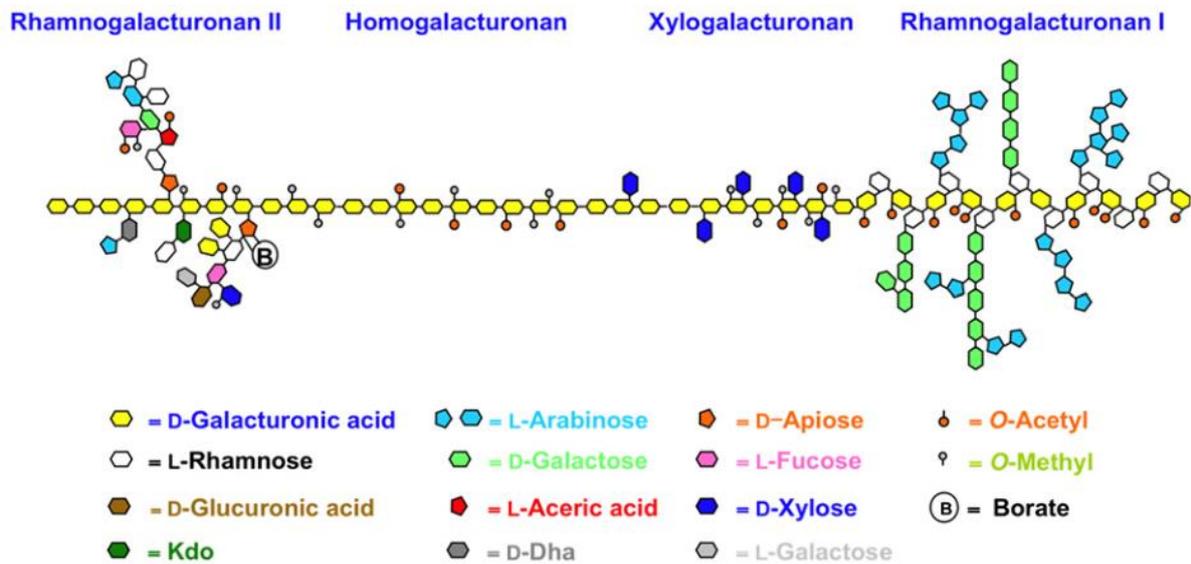


Figure 5 : formule générale de la pectine (tiré de 58).

2.2.1.1. Homogalacturonane

La partie homogalacturonane est constituée d'un polymère linéaire composé majoritairement d'unités acide D-galacturonique (au moins 65%) liées entre elles par des liaisons glycosidiques α-(1-4). Les groupements carboxyles présents sur les carbones 6 des unités acide galacturonique peuvent être partiellement estérifiés (par un méthyle). Les groupes acides libres peuvent être partiellement ou totalement neutralisés avec des ions potassium, sodium ou ammonium (63).

Les pectines sont classées en fonction de leur degré d'estérification. En fonction de la quantité de groupements carboxyles qui sont estérifiés avec des groupes méthyles, il est possible de déterminer le degré d'estérification ou encore degré de méthoxylation. Les pectines avec plus de 50% de leurs groupes carboxyles estérifiés sont appelées « pectines hautement estérifiées » (High Methoxyl Pectin, HMP). Au contraire, les pectines avec moins de 50% de leurs groupements carboxyles estérifiés sont appelées « pectines faiblement estérifiées »

(Low Methoxyl Pectin, LMP). Cette caractéristique est directement liée à la capacité des pectines à gélifier. En effet, le mécanisme de gélification de ces deux types de pectines ne sont pas les mêmes. Les HMP forment des gels dits « acides » tandis que les LMP forment des gels dits « calcium » (64).

Les HMP forment des gels si le pH est inférieur à 3,6 et si un co-soluté est présent (par exemple le saccharose à une concentration supérieure à 55% en masse). Dans le cas des LMP, un gel est formé en présence de Ca^{2+} qui sert de pont entre deux groupes carboxyles (65).

Les xylogalacturonanes sont des homogalacturonanes qui sont substitués par un D-xylose-(1-3) sur la position O-3 par une liaison β . La proportion de groupements xylogalacturonanes par rapport aux homogalacturonanes va de 40 à 90%. Le degré de xylosidation peut être très différent en fonction de la source (on peut observer des différences de l'ordre de 25% à 75% entre une pectine de pomme et de pastèque). Ces parties xylogalacturonanes sont associées à des fonctions de stockage et de reproduction dans les plantes (66).

2.2.1.2. *Rhamnogalacturonane-I (RG-I)*

La partie RG-I est constituée d'un squelette de polysaccharides pectiques qui consiste en un motif $[\alpha - \text{D} - \text{GalA-1,2-}\alpha\text{-L-Rha-1,4}]_n$ qui se répète (67). Cette région est très largement substituée par des sucres neutres tels que l'arabinose et le galactose, ce qui a pour conséquence la formation d'arabinanes, de galactanes et d'arabinogalactanes sur les chaînes secondaires du rhamnose, majoritairement liés par la position O-4. La proportion de ces substitutions et leur longueur peut varier en fonction de la source (68). La région RG-I peut contenir jusqu'à 300 rhamnosyles et 300 résidus acides galactosyluroniques. Le fort taux de branchement de cette région lui vaut d'ailleurs le nom de « région chevelue » (63).

Les arabinogalactanes sont présents sous deux formes différentes qui sont nommées arabinogalactane I (AGI) et arabinogalactane II (AGII). La forme AGI consiste en une chaîne linéaire de β -D-galactoses liés par des liaisons 1-4 et qui contiennent jusqu'à 25% de résidus α -L-arabinoses en chaînes secondaires. Ce type d'arabinogalactanes a été trouvé dans différentes espèces végétales tels que les citrus, la pomme de terre, le soja, le lupin, les pommes, les oignons, les tomates, le chou et le kiwi (69).

La partie AGII est, elle, composée de chaînes ramifiées ayant un squelette de motifs β -D-galactose liés par liaison 1-3. Ce squelette principal est ramifié par de nombreuses chaînes

latérales α -L-arabinose-(1→6)-[β -D-galactose-(1→6)]_n avec n allant de 1 à 3 (59). De plus, les résidus galactosyles peuvent également être substitués par des chaînes latérales d' α -L-arabinose (en liaison 1-3). Il est aussi possible que le domaine AGII soit associé avec des protéoglycanes connus sous le nom de protéines d'arabinogalactane (arabinogalactane proteins, AGPs). Cette partie protéique est riche en aminoacides tels que la proline ou l'hydroxyproline, le sérine et la thréonine (70,71).

2.2.1.3. *Rhamnogalacturonane-II (RGII)*

La partie RGII de la pectine est de loin la plus complexe en termes de structure mais est aussi la partie qui est la plus constante parmi toutes les différentes sortes de pectines. Cette partie est constituée d'un squelette linéaire d'unités d'acide galacturonique, substituées avec du L-rhamnose et du D-galactose. On trouve également beaucoup d'autres sucres moins habituels tels que l'apiose, l'acide acérique, le 3-O-méthyl-L-fucose, le 2-O-méthyl-D-xylose, le 3-C-carboxy-5-deoxy-L-xylose, l'acide 3-deoxy-D-manno-octulosonique et l'acide 3-deoxy-D-lyxo-heptulosarique (72). Il y a donc une douzaine de sucres différents avec plus de 20 types de liaisons différentes. Une réticulation entre les domaines RGII de deux pectines voisines augmente l'intégrité du réseau formé. De plus, grâce à sa structure, ce domaine est capable de former des dimères avec des esters de borate (73).

2.2.2. *Biosynthèse*

Dans le règne végétal, la pectine est un élément principal de la structure des cellules. Ce polysaccharide est produit de toute évidence dans l'appareil de Golgi et est ensuite transporté dans la paroi des cellules par des transporteurs vésiculaires. L'appareil de Golgi est constitué de plusieurs régions et la synthèse de la pectine semble se dérouler dans les régions nommées cis-, médial et trans-Golgi (74).

La synthèse de la pectine demande l'activité de nombreuses enzymes. Des glycotransférases vont transférer des résidus glycosyles depuis des sucres vers des accepteurs de polysaccharides. Des méthyltransférases vont catalyser des réactions d'estérification ou de O-méthylation ou bien des acétyltransférases vont catalyser les réactions d'acétylation. En tout, le nombre d'enzymes impliquées dans la synthèse de la pectine est évalué à au moins 58 (75). Ces enzymes sont nécessaires à la fabrication des différents domaines (HG, RG-I et RG-II).

Les méthylestérases vont avoir une action sur les domaines HG présents dans la membrane cellulaire et vont avoir tendance à le dé-estérifier jusqu'à un certain degré. Cette conversion est associée avec la fin de la croissance de la plante et avec l'association des domaines HG entre eux par des liaisons ioniques impliquant du calcium. Ainsi, différentes étapes de la pousse des plantes conduisent à différents motifs de dé-estérification et par conséquent à des structures potentiellement différentes (59).

2.2.3. Sources

La pectine est naturellement présente dans presque toutes les plantes ou matières végétales. Les pectines que l'on trouve sur le marché sont principalement extraites de fruits et d'agrumes tels que les oranges, les citrons, les pamplemousses ou les pommes. L'avantage de ces sources est qu'il est possible d'utiliser les déchets des productions de produits fruitiers (jus de fruits par exemple) et donc de limiter les déchets. La couleur de la pectine obtenue peut être légèrement différente en fonction de la source (76). La pulpe de pomme séchée contient entre 10 à 15% en poids de pectine et pour les agrumes, cela se situe entre 20 et 30% (77).

D'autres fruits peuvent être utilisés mais généralement les fruits tels que les coings, les prunes ou les groseilles à maquereaux ont une teneur en pectine plus importante que les fruits mous comme les cerises, le raisin ou les fraises. A titre d'exemple on trouve environ 1%, 0,4%, 0,5-3,5% et 1,4% de pectine dans l'abricot, les cerises, l'orange et la carotte respectivement (basé sur le poids frais) (77).

De nombreuses sources de pectine sont également disponibles du côté des déchets industriels ou de sous-produits comme par exemple la betterave sucrière ou encore les têtes de tournesol, les déchets de mangue, ou de production d'huile d'olive...(77).

Cependant, bien que la pectine de betterave soit facile d'accès et plutôt bon marché, elle possède plusieurs désavantages qui font qu'elle n'est pas largement utilisée industriellement. Elle ne possède pas de fortes capacités gélifiantes par rapport à d'autres pectines comme celle de pomme ou de citrus. Cependant, la pectine de betterave a quelques particularités intéressantes. Elle possède des capacités émulsifiantes supérieures aux pectines issues de sources classiques (78). Elle contient aussi des résidus acides féruliques qui permettent la formation d'un réseau covalent sous l'influence d'un oxydant. Toutes ces caractéristiques font

que la pectine de betterave peut être intéressante pour des applications différentes des autres pectines issues de sources naturelles (79).

En ce qui concerne les têtes de tournesol, la pectine est extraite à partir des résidus après extraction de l'huile. Cette pectine a des propriétés gélifiantes intéressantes et une teneur en acide galacturonique élevée (80). D'autres études montrent la présence de pectine dans la pulpe de pomme de terre, de courge, la pulpe de pêche ou les graines de lin (81–84).

2.2.4. Méthodes d'extraction

Bien que les sources de pectines soient très variées, les méthodes d'extraction restent globalement les mêmes et sont applicables pour quasiment toutes les filières. Il existe des méthodes traditionnelles mais depuis quelques années de nouvelles techniques plus innovantes arrivent sur le marché.

La technique la plus traditionnelle est celle de l'extraction solide-liquide avec de l'eau acidifiée, en utilisant des acides minéraux. La pectine est alors extraite dans de l'eau acidifiée chauffée (80 – 100°C) pendant quelques heures sous agitation (85). Le résultat de cette technique dépend de plusieurs facteurs tels que la température, la valeur du pH de travail, les propriétés du solvant utilisé, la source, etc. Cette technique, bien que simple à mettre en œuvre, présente plusieurs désavantages. Lors d'un traitement acide, il est possible de perdre certains composés volatils ou bien de dégrader des produits d'intérêt dans la pulpe de fruit. Il y a également un problème du point de vue environnemental ainsi qu'une augmentation des coûts pour l'industriel. C'est pour ces raisons que de nouvelles méthodes voient le jour (86).

Une de ces méthodes utilise les ultrasons pour faciliter l'extraction. Les ultrasons, en faisant imploser les bulles de cavitation dans les environs des parois cellulaires permettent de les détruire et donc de faciliter la pénétration du solvant (87). De plus, les chocs causés par les ultrasons seraient responsables d'une augmentation du gonflement des cellules, ce qui augmenterait la taille des pores et faciliterait également le processus d'extraction (88). Cette méthode présente l'avantage d'être moins énergivore puisqu'il n'est pas nécessaire de chauffer le milieu. De plus, elle permet d'utiliser moins de solvant, d'avoir un temps de traitement moindre et d'obtenir un meilleur rendement (89).

Une deuxième méthode utilise les micro-ondes. La technique par micro-ondes, par ses caractéristiques physiques, induit une augmentation de température des composés polaires au sein de l'échantillon à extraire (principalement l'eau mais pas uniquement). Cette augmentation interne de la température va avoir pour effet la destruction des parois cellulaires, ce qui va libérer les composés d'intérêts dans le solvant. Si un solvant non polaire ou peu polaire est utilisé, celui-ci ne verra sa température augmenter que faiblement, ce qui va attirer les composés sensibles à la chaleur (qui sont les produits que l'on souhaite extraire). Cette méthode est également moins coûteuse en énergie que la méthode traditionnelle et consomme également moins de solvant. Enfin, les temps de traitement sont largement diminués (90).

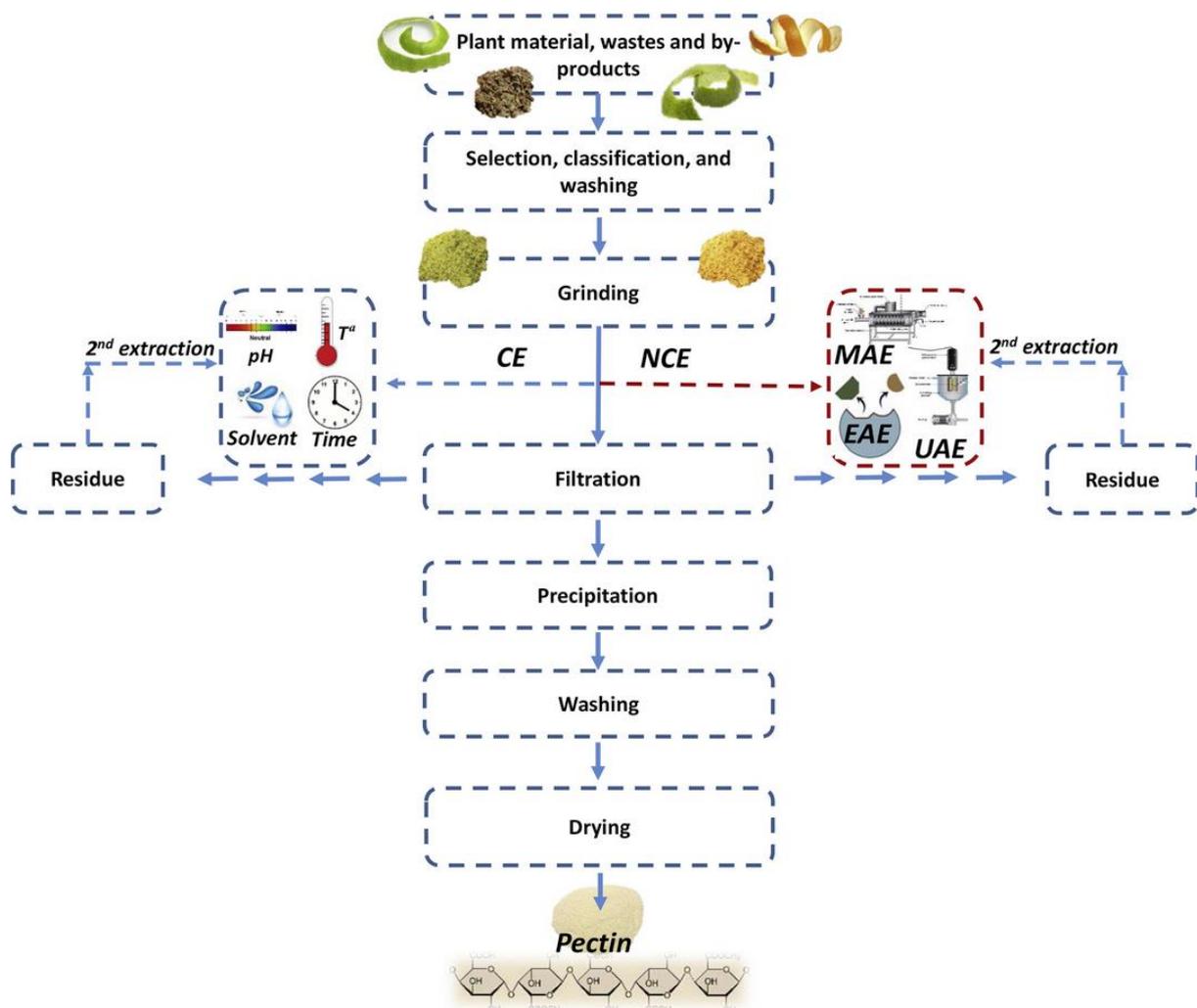


Figure 6 : Schéma classique de l'extraction de la pectine à partir de ressources naturelles. CE : Conventional Extraction, NCE : Non-Conventional Extraction, EAE : Enzyme-Assisted Extraction, MAE : Microwave-Assisted Extraction, UAE : Ultrasound-Assisted Extraction (Extrait de 86)

La dernière méthode innovante présentée est celle qui utilise des enzymes. Les enzymes (cellulases, pectinases et hemicellulases) vont permettre d'hydrolyser les parois cellulaires et donc augmenter la perméabilité des cellules. Le rendement peut être augmenté par rapport aux techniques traditionnelles grâce à la grande spécificité des enzymes et à basse température, diminuant la consommation d'énergie (91). Cette méthode peut aussi être combinée avec la méthode d'extraction acide, ce qui permet de diminuer la quantité de solvant à utiliser et de diminuer la corrosion des équipements. L'utilisation d'enzymes permet également de limiter les étapes de neutralisation des déchets et la pectine obtenue est de grande qualité. Cependant cette méthode est celle qui présente le plus de points négatifs et elle est encore en développement. En effet, les enzymes coûtent cher lorsque l'on veut travailler sur de grandes quantités de matière première. De plus, les enzymes actuellement disponibles ne permettent pas de détruire totalement la paroi cellulaire et ce procédé est difficile à implémenter à des échelles industrielles car les enzymes sont très sensibles (92).

2.2.5. Mécanismes de gélification

Les pectines ont la capacité de former des gels et c'est ce qui les rend attractives. Comme le mécanisme de gélification dépend majoritairement du degré d'estérification, on peut attendre des mécanismes différents pour les pectines faiblement méthoxylées (LM) et les pectines fortement méthoxylées (HM) (64). Le procédé de gélification des pectines est affecté par de nombreux facteurs, aussi bien inhérents à la molécule qu'aux conditions extérieures (degré de méthylation, densité de charge, force ionique, température...) (93).

Dans le cas des pectines HM, le degré d'estérification est généralement de l'ordre de 50 à 80% et le mécanisme de gélification nécessite des conditions particulières. Il faut que le pH soit faible (entre 2,5 et 3,5) et la présence de co-solutés solides comme le saccharose, le sorbitol ou encore l'éthylène glycol est requise. Ces sucres vont servir à réduire l'activité de l'eau et donc à stabiliser les liaisons hydrophobes (94). Les gels à partir de pectine HM sont généralement réversibles thermiquement, les pectines HM sont solubles dans l'eau chaude (94).

En ce qui concerne les pectines LM, moins de 50% des groupements carboxyles sont estérifiés. La gélification ne dépend pas de la présence de sucres et les gels sont généralement plus stables chimiquement contre l'humidité et la température, et supportent mieux les

changements de pH (95). Les pectines LM peuvent gélifier en présence d'ions divalents comme le calcium. Le procédé de gélification peut être facilement inversé par l'ajout d'ions monovalents comme le potassium ou le sodium (96). Dans ce genre de système, la gélification se fait par des interactions électrostatiques qui entraînent la formation de jonctions entre des groupes carboxyles de zones homogalacturoniques de différentes molécules (modèle boîte à œufs comme pour l'alginate) (97). La structure des pectines joue aussi sur les capacités de celles-ci à gélifier. Plus le degré d'estérification est faible, plus la gélification est favorisée. Les pectines LM avec une distribution des groupes carboxyles libres en blocs sont très sensibles à la gélification, même pour des teneurs en calcium faibles. Certaines pectines de plantes comme la betterave ou la pomme de terre ont des groupements acétyles dans leur structure ce qui empêche la formation de gels, mais confère des propriétés émulsifiantes (98). La texture des gels obtenus avec des pectines LM peut être modulée en fonction du ratio calcium/pectine. Un gel avec une forte teneur en pectine et peu de calcium aura une texture élastique. Dans le cas contraire, beaucoup de calcium par rapport à la pectine, on aura un gel beaucoup plus friable (99).

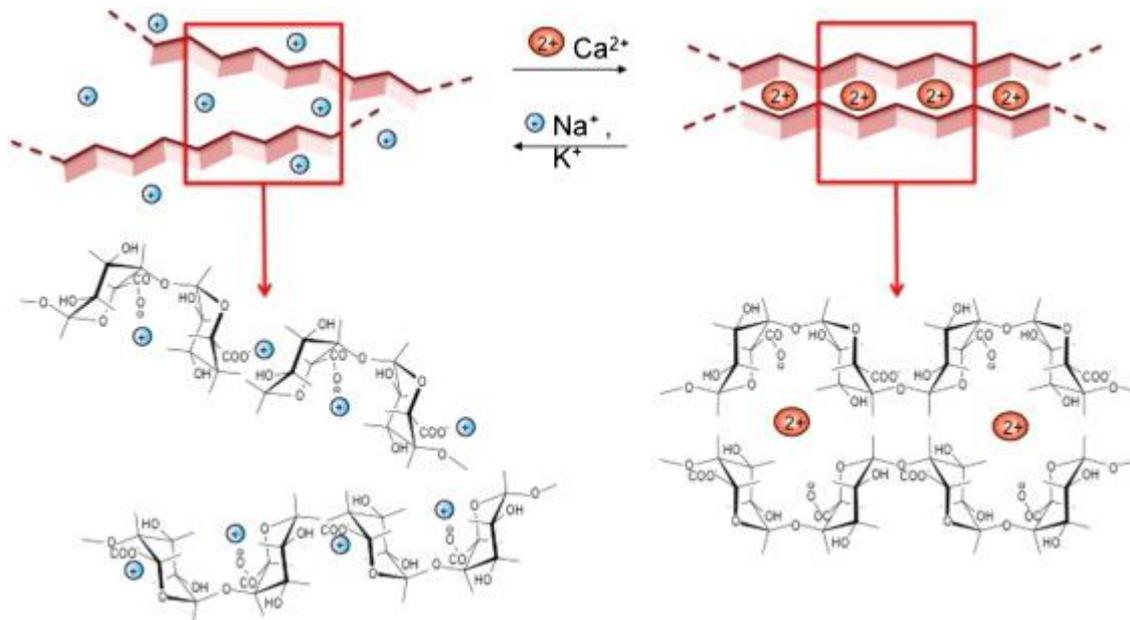


Figure 7 : Mécanisme de gélification des pectine LM et leur réversibilité (extrait de 96).

2.2.6. Applications de la pectine

La pectine étant un polymère naturel présent dans de nombreux fruits, elle a été le sujet de nombreuses études et des utilisations ont été trouvées dans de nombreux domaines tels que l'alimentaire, le médical ou encore le domaine pharmaceutique. Des recherches sont toujours menées aujourd'hui pour trouver de nouvelles applications ou améliorer l'existant. Citer toutes les applications serait trop long mais voici quelques exemples parlant d'utilisation de la pectine.

2.2.6.1. Applications thérapeutiques

La pectine en tant que prébiotique

Les prébiotiques sont des substances à ingérer et qui affectent la santé via de nombreux mécanismes. Un exemple d'application est leur effet sur le microbiote intestinal. La consommation de pectine joue un rôle positif sur la population du microbiote et favorise la fabrication de composés tels que des acides gras à courte chaîne ou des gaz qui affectent positivement l'état de santé. Les pectines sont également considérées comme des fibres qui vont agir sur le transit intestinal, réduisant la vidange gastrique, le temps de transit ou l'absorption de glucose (100).

Effets sur les niveaux de glucose

Plusieurs études montrent que la pectine a une influence sur la régulation de la quantité de glucose dans le sang. Il a été montré que la consommation de pectine améliore le métabolisme du glucose en augmentant l'excrétion de glucose par les urines (101). D'autres études indiquent que la pectine agit en réduisant l'absorption du glucose par le corps ce qui induit une diminution de la production d'insuline. Cette réduction de la production d'insuline entraîne une diminution de la production de cholestérol (102).

Utilisation pour retirer des ions métalliques

Certains métaux toxiques empêchent le bon fonctionnement de différents systèmes du corps humain tels que le système neurologique, le système immunitaire ou encore le système endocrinologique. Il existe aujourd'hui des méthodes de traitement des intoxications aux métaux qui utilisent des chélateurs spécifiques qui vont faciliter l'élimination par les urines ou les selles. Cependant ces traitements peuvent avoir des effets secondaires néfastes sur le

corps (redistribution des ions aux mauvais endroits, réduction de la quantité des ions essentiels...) (103).

La pectine a des capacités de liaison avec les métaux via notamment son mode de chélation en boîte à œufs. L'avantage de la pectine qu'elle se lie aux métaux dans le tube digestif, ce qui permet de faciliter leur évacuation par les selles tout en limitant leur absorption. Cependant, la structure irrégulière de la pectine ne permet pas d'avoir un très bon rendement de chélation et des modifications structurales peuvent être envisagées pour améliorer cela (59).

Prévention du cancer

Il semble que la pectine présente une forme de synergie avec certaines substances anticancéreuses pour plusieurs types de cancers chez l'humain ou l'animal. De plus, les activités antitumorales de la pectine sont connues depuis plusieurs années. Les mécanismes d'actions sont toujours à l'étude mais il semblerait que l'action dépende de la structure de la pectine. Les pectines et pectines modifiées de citrus ont été largement testées sur différents types de cancers (implantés sur des rats). Les résultats montrent une action positive sur des cancers des poumons et métastases (104,105). D'autres types de cancers sont aussi affectés par la pectine tels que le cancer de la prostate, du colon, du pancréas ou du sein (106–109).

2.2.6.2. Autres applications (65,110)

En dehors des applications dans le domaine de la santé, la pectine est également très utilisée dans le domaine de l'alimentaire. De par ses nombreuses propriétés (gélifiantes, émulsifiantes, stabilisantes), on retrouve la pectine dans de nombreux produits.

Une des utilisations les plus représentées est la gélification au sein de confitures par exemple mais dans beaucoup d'autre préparations également, dès lors qu'il faut épaissir le milieu. L'avantage d'utiliser des pectines, et en particulier des pectines faiblement méthylées, est que celles-ci sont stables en milieu acide. Dans le milieu de la boulangerie, un autre avantage s'ajoute puisque les gélifications induites par la pectine n'est pas sensible à la température. Il est donc possible de faire cuire une préparation à base de pectine sans que celle-ci ne se liquéfie dans le four.

Dans le milieu des surgelés, l'ajout de pectine dans la préparation ralentit la formation de cristaux de glace et limite la perte de liquide des aliments. Par exemple, en formant un film

autour de fruits, ceux-ci, intégrés dans la préparation gelée, seront protégés et garderont leur forme et leur jus. Cet effet est principalement dû à la gélification dans le milieu grâce aux cations Ca^{2+} .

Dans le domaine des jus de fruits, il y a une augmentation de l'intérêt des consommateurs pour les produits dits diététiques, avec moins de sucres ajoutés. Cependant, la baisse du niveau de sucre entraîne une baisse de l'impact gustatif. Cette baisse est due à une agrégation des dépôts de fruits qui est difficile à disperser. L'ajout de pectine dans le liquide permet d'éviter cette agrégation et de restaurer les propriétés organoleptiques du jus de fruit.

Enfin, quelques autres utilisations peuvent être notées liées aux propriétés de formation de films de la pectine. On retrouve des utilisations dans les domaines du papier, du textile, des membranes de dialyse et de la fabrication de polymères biosourcés.

B. Interactions protéines-polysaccharides

1. Introduction

Les systèmes contenant des protéines et des polysaccharides sont largement utilisés dans les industries agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (111–113). En effet, du fait de leur nature, ces biopolymères sont, pour la majorité, d'origine naturelle, biodégradables et biocompatibles. Ces atouts en font des matières premières de choix pour de nombreuses utilisations dans les domaines du vivant. En plus de ces propriétés, les systèmes protéines-polysaccharides possèdent des capacités intéressantes pour de nombreuses préparations en tant que stabilisants ou texturants mais aussi dans le domaine de l'encapsulation (113). Malgré leur utilisation courante, ces systèmes ont des comportements complexes et de nombreux paramètres entrent en jeu pour comprendre et décrire ces mélanges : ratio des biopolymères, force ionique, pH, concentrations, température... (111,114).

2. Nature des interactions entre protéine et polysaccharide

Lorsqu'une protéine et un polysaccharide sont mis en contact dans une solution, de nombreuses interactions peuvent avoir lieu en fonction de la nature des biopolymères et des conditions physico-chimiques. Il existe 4 grandes familles d'interactions non covalentes qui ont lieu dans ce genre de systèmes.

2.1. Les interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques sont importantes dans le cas où les biopolymères portent des charges électroniques. De manière générale, deux biopolymères de charge nette globale identique vont avoir tendance à se repousser. Lorsqu'ils portent des charges opposées, une attraction sera plus probable (115). Cependant, même si un biopolymère porte une charge nette globale positive, la répartition des charges n'est généralement pas homogène sur tout son squelette et des zones chargées peuvent apparaître (116). Ces zones peuvent alors interagir avec des zones de charge opposée d'un autre biopolymère et conduire à une agrégation. Il est important de noter que la charge nette globale des biopolymères peut être modifiée en fonction du pH du milieu. En effet, les protéines possèdent une valeur de pH spécifique, appelée point isoélectrique (ou pI), pour laquelle leur charge globale est nulle. Au-dessus de ce point, les protéines ont une charge globale négative tandis qu'au-dessous, la charge nette globale est positive (117). Les polysaccharides peuvent avoir un pKa qui indique les charges portées par les groupements acido-basiques. De la même manière, la présence d'ions (ajout de NaCl par exemple) peut influencer ces interactions. La portée et la force de ces interactions est généralement diminuée quand la force ionique est augmentée (118).

2.2. Les interactions d'exclusion stérique

Les biopolymères occupent généralement des volumes importants en solution ce qui implique que les effets stériques peuvent être importants. En effet, il y a une réduction de l'entropie de mélange du système à cause d'une réduction du volume disponible pour les biopolymères, qui

entrent alors en compétition pour occuper l'espace (118). Ce genre d'interactions va avoir tendance à favoriser la situation dans laquelle chaque polymère se retrouve dans sa propre phase, conduisant le plus souvent à une séparation de phase (119).

2.3. Les interactions hydrophobes

Ce genre d'interactions a lieu en solution aqueuse entre des polymères qui portent des groupements non polaires (hydrophobes). Cette interaction se traduit par une tendance pour les groupes non polaires à s'associer entre eux. Le fait d'augmenter la température du milieu peut favoriser ce genre d'interactions (120).

2.4. Les liaisons hydrogènes

Les liaisons hydrogènes ont lieu entre un atome d'hydrogène d'une molécule et un atome électronégatif. Ce genre d'interaction est plutôt fort mais son intensité diminue avec l'augmentation de la température (114). Ce type de liaison tend à associer des molécules entre elles mais a également lieu de manière intramoléculaire lorsque la structure le permet (structure en hélice ou en feuillet par exemple) (118).

3. Séparations de phases de polymères en solution aqueuse

3.1. Diagrammes de phase (121)

Lorsqu'une protéine et un polysaccharide sont dissous ensemble en solution aqueuse, plusieurs comportements peuvent être observés en fonction de différents paramètres, tels que la concentration totale en biopolymères, le ratio des deux polymères, le pH ou encore la force ionique du milieu. Ces différents paramètres sont largement étudiés dans la littérature et les comportements résultants sont plutôt bien détaillés (119,122,123). Il y a 4 comportements principaux dans les cas de mélanges de biopolymères, qui vont être détaillés ci-après, mais avant cela, il est nécessaire de parler des diagrammes de phase, qui permettent

de « cartographier » facilement les conditions physico-chimiques de séparation de phase de ces mélanges.

Les diagrammes de phase sont des outils puissants permettant de représenter le comportement d'un mélange de composés à l'équilibre thermodynamique en fonction de leurs concentrations respectives. On trouve dans ce diagramme une ligne frontière appelée ligne binodale, qui sépare les mélanges appelés « monophasiques » des mélanges « biphasiques ». Un mélange de biopolymères en solution représente alors un seul point dans ce diagramme. Ainsi, une composition de mélange en-dessous de la ligne binodale sera monophasique, c'est-à-dire qu'aucune séparation de phase n'aura lieu. Au contraire, une composition se trouvant au-dessus de la ligne binodale subira une séparation de phase et deux phases distinctes pourront être observées (précipité, émulsion, ou séparation complète). Les concentrations en polymères des deux phases résultant de la séparation pourront être déterminées grâce aux droites de conjugaison. Ces droites partent du point indiquant la composition du système et interceptent la ligne binodale en deux points. Ces deux points indiquent les compositions des deux phases obtenues après la séparation de phase.

Par exemple, le mélange d'une solution A d'une protéine avec une solution B de polysaccharide conduira au mélange C. Comme ce mélange se trouve dans le domaine biphasique, il se séparera à son tour en deux phases, résultant en une phase D riche en protéine et une phase E riche en polysaccharide.

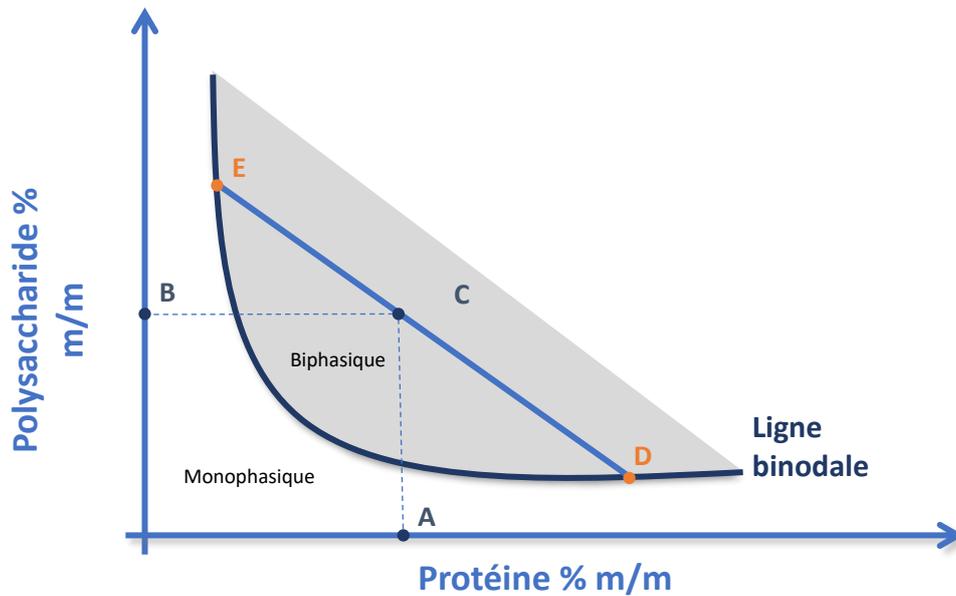


Figure 8 : Représentation schématisée d'un diagramme de phase pour deux solutions.

Les mélanges de protéines et de polysaccharides peuvent être représentés sur des diagrammes de phase et il est alors possible de prévoir le comportement du mélange étudié. La séparation de phase entre ces deux composés est courante et peut être le résultat de nombreuses interactions. Ces interactions complexes peuvent être de nature attractive ou bien répulsive.

3.2. Interactions attractives

Lorsque des interactions attractives entrent en jeu, il peut y avoir ou non séparation de phase. De manière générale, les deux biopolymères vont interagir ensemble et former des complexes. Ces complexes peuvent être soit solubles, soit insolubles. Dans le cas de complexes solubles, il n'y aura pas de séparation de phase. Au contraire, si des complexes insolubles se forment, un précipité (séparation de phase liquide-solide) ou un coacervat (séparation de phase liquide-liquide) apparaîtra et la séparation de phase sera alors évidente (124). La coacervation est un phénomène généralement réversible et qui consiste en la formulation d'une phase riche en biopolymères (le coacervat) et d'une phase riche en solvant, ces deux phases ne se mélangeant pas. Les interactions attractives peuvent se manifester entre deux molécules ayant des charges électroniques opposées. Ces charges étant amenées à être

modifiées en fonction du pH ou bien masquées en présence de sels, le système n'a pas un comportement fixe et celui-ci dépendra des conditions du milieu (125).

3.3. Interactions répulsives

En présence d'interactions répulsives, à nouveau, deux cas sont possibles, on peut avoir ou non séparation de phase. Dans le cas de faibles concentrations en biopolymères, il est possible d'obtenir un système monophasique. La protéine et le polysaccharide seront alors co-solubles, tant que l'on reste sous le seuil de co-solubilité (même si à l'échelle macroscopique le mélange des deux polymères semble homogène, à l'échelle moléculaire, les domaines de chaque polymères vont exclure les molécules de l'autre polymère (112)). Si l'on passe au-dessus de ce seuil, il y aura séparation de phase et on parle alors d'incompatibilité thermodynamique. Chaque polymère va alors prendre sa « part » de solvant et former une phase, en excluant les molécules de l'autre polymère.

L'incompatibilité thermodynamique est régie par la seconde loi de la thermodynamique :

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M$$

Avec ΔG_M l'enthalpie libre, ΔH_M correspondant à l'enthalpie de mélange, ΔS_M à l'entropie de mélange et T à la température (126). Pour que les deux constituants se mélangent spontanément, il faut qu'une diminution de ΔG_M soit observée par rapport à l'état où les deux polymères ne se mélangent pas. Il y a trois principales contributions à l'enthalpie libre qui sont l'entropie de mélange combinatoire, l'interaction moléculaire et les effets de volume libre.

L'entropie de mélange est liée au nombre de permutations ou de combinaisons possibles pour une molécule dans le système liquide (cela peut se traduire par le désordre de position du liquide). Pour des polymères ayant de hauts poids moléculaires, ce terme tend à disparaître à cause du faible nombre de possibilités de mobilité de ces macromolécules (126,127).

L'interaction moléculaire apporte toujours une contribution positive à ΔG_M et ne peut donc pas être la cause d'une compatibilité entre polymères. Il existe cependant certains cas rares où cette contribution peut être négative et cela implique généralement un transfert de charge ou une liaison hydrogène.

L'effet de volume libre rapproche les molécules du système, causant une contribution négative à ΔH_M et ΔS_M qui ne s'annulent pas dans ΔG_M mais qui laissent une contribution globale positive et donc défavorable au mélange (126).

Ainsi, on ne peut avoir une compatibilité complète que si la différence d'entropie ΔS_M entre un système à une phase et un système à deux phases est plus grande que l'enthalpie de mélange ΔH_M (127).

Le schéma ci-après résume de manière illustrée les différents cas évoqués :

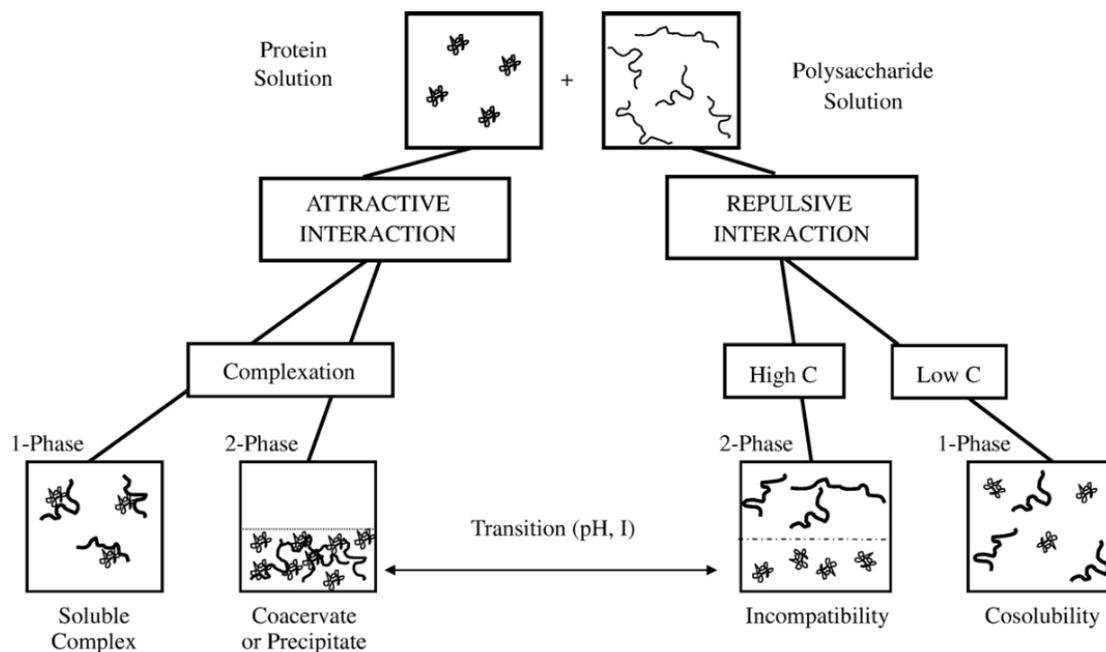


Figure 9 : Interactions entre protéines et polysaccharides en solution (118).

En résumé, il est donc possible d'observer 4 comportements majeurs dans le cas d'un mélange protéine-polysaccharide :

- Une séparation de phase associative (complexation ou coacervation)
- Une séparation de phase ségrégative (incompatibilité thermodynamique)
- Un mélange homogène constitué de complexes solubles (dans le cas d'interactions attractives)
- Un mélange homogène constitué de molécules indépendantes (dans le cas d'interactions répulsives et pour de faibles concentrations en polymères).

Cependant, ces 4 comportements ne suffisent pas à décrire totalement le système. En effet, dans de nombreux cas, une interface est présente (eau/air, eau/huile...). Le comportement des polymères à l'interface est différent de celui en solution et sera l'objet du prochain chapitre.

4. Mélange de protéines et de polysaccharides à l'interface

Les comportements de la protéine et du polysaccharide à l'interface sont différents. Ces deux biopolymères vont être considérés séparément dans un premier temps, puis en mélange. En effet, il est important de comprendre leurs comportements respectifs à l'interface en plus de comprendre leur comportement en mélange.

4.1. Protéines à l'interface

Les protéines possèdent des propriétés tensioactives en raison de leurs résidus hydrophiles et hydrophobes, elles sont donc aptes à avoir un comportement particulier à l'interface. En effet, les protéines vont avoir tendance à s'adsorber à l'interface entre deux fluides, la partie hydrophile orientée vers la phase aqueuse, la partie hydrophobe orientée vers la phase hydrophobe (128). Toutes les protéines n'ont néanmoins pas la même activité interfaciale (112).

Le mécanisme d'adsorption d'une protéine à une interface est décomposé en plusieurs étapes. La première étape est une diffusion depuis la solution vers l'interface. Une fois à proximité de l'interface, l'adsorption à proprement parler a lieu. Cela est possible uniquement lorsque la protéine peut passer la barrière énergétique qui est généralement de l'ordre de $2-20 \cdot k \cdot T$ (avec k la constante de Boltzmann et T la température) (129). Lorsque l'adsorption s'est déroulée, un réarrangement de la protéine permet aux groupements hydrophobes de se déployer pour couvrir au mieux l'interface. Cette étape est généralement irréversible. La quatrième et dernière étape est une consolidation de l'interface. Une réticulation intermoléculaire entre les protéines permet une meilleure stabilité de l'interface. Il peut également avoir un phénomène de recuit si le milieu est chauffé ou encore une séparation

de phase locale. Ces procédés affectent directement les propriétés de l'interface à long terme (129).

4.2. Polysaccharides à l'interface

La majorité des polysaccharides de haut poids moléculaire sont hydrophiles, ce qui veut dire qu'ils ne vont pas tendre à se déplacer à l'interface mais vont préférer rester en phase aqueuse. Il a été reporté que la plupart des polysaccharides possèdent une activité tensioactive, mais cela a été attribué à la présence d'impuretés de nature protéique (2-4%) (112). Cependant, la nature chimique spécifique de certains polysaccharides leur permet tout de même de posséder une activité à l'interface.

Dans le cas de la gomme arabique par exemple (qui est beaucoup utilisée pour stabiliser des émulsions et dans des boissons, soupes et gâteaux), la propriété d'émulsification est due à la présence de protéines : l'arabinogalactane, qui représente environ 10% de la gomme et une fraction de glycoprotéines (qui représente environ 1% de la gomme) (130).

Les pectines possèdent également des comportements spéciaux. La présence de groupements acétyles (4-5%), qui augmentent le caractère hydrophobe du polysaccharide, pourrait le doter de propriétés tensioactives. Par exemple, dans le cas de la pectine issue de la betterave sucrière, on remarque que la fraction adsorbée sur des gouttelettes de limonène lors de l'émulsification, contient environ 11% de protéine et 2.16% d'acide férulique. On remarque aussi que le degré d'acétylation de la fraction est important, principalement en position C2 des résidus de l'acide galacturonique, ainsi qu'une proportion importante de sucres neutres, qui sont présents dans les chaînes latérales ramifiées de la pectine (131).

Les dérivés de la cellulose ont une tendance forte à s'accumuler aux interfaces air/eau et huile/eau (132). Cependant, seulement 4 d'entre eux sont utilisés dans le domaine de l'agroalimentaire pour leurs propriétés tensioactives : la méthylcellulose (MC), la carboxyméthylcellulose (CMC), l'hydroxypropylcellulose (HPC) et l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC). Les parties hydrophobes du squelette de la cellulose sont celles riches en groupes méthoxyles alors que les parties hydrophiles sont plutôt riches en groupes hydroxypropyles. Par exemple, l'HPMC montre différentes activités tensioactives en fonction du ratio méthoxyle/hydroxypropyle (133).

Les ester de l'acide alginique, l'alginate de propylène glycol par exemple, possèdent également des propriétés interfaciales. L'augmentation du degré d'estérification a pour conséquence une diminution globale de l'hydrophilie de la molécule. Cela entraîne des propriétés interfaciales modulables selon ce même degré d'estérification. Contrairement aux monocouches de protéines ou de celluloses modifiées, pour lesquelles une forte interaction existe entre les molécules adsorbées, formant une structure de type gel à l'interface, dans le cas de l'adsorption du PGA, il n'y a pas de réarrangement car la structure est moins complexe et forme des structures avec une plus faible élasticité dilatationnelle (134).

4.3. Mélanges protéine – polysaccharide

Lorsqu'une interface est formée et que la phase aqueuse contient un mélange de protéine et de polysaccharide, le comportement interfacial peut devenir compliqué. Nous venons de voir que les protéines et les polysaccharides pouvaient avoir une activité interfaciale lorsqu'ils sont seuls en solution. Mais comment cela se passe-t-il lorsque les deux sont présents en même temps ?

On peut distinguer les différents cas possibles en fonction de la nature des interactions entre protéines et polysaccharides. Nous avons vu dans la partie précédente qu'il existait différents types d'interactions telles que les interactions attractives et les interactions répulsives ou d'incompatibilité thermodynamique.

4.3.1. Dans le cas d'interactions attractives

De manière à pouvoir comprendre un système comme celui-ci, plusieurs facteurs clés sont à prendre en compte. Parmi ces facteurs, on peut nommer les charges électrostatiques des complexes formés par les deux polymères (ce qui est contrôlé par les densités de charges de deux polymères dans la solution) et l'ordre d'adsorption des polymères à l'interface (de manière simultanée ou décalée) (112). Plusieurs exemples sont présents dans la littérature pour illustrer les implications de la présence d'interactions attractives entre les polymères sur les activités de surface. Ganzevles et al. ont montré que la formation de complexes entre la β -lactoglobuline et une pectine méthoxylée entraînait une baisse d'un facteur 100 de la vitesse d'augmentation de la pression interfaciale et diminuait la formation de mousse (135). De la même manière, Kudryashova et al. ont étudié le système ovalbumine/pectine (136). Le fait

d'avoir une formation de complexes dans la solution entraîne une adsorption plus lente de la protéine à l'interface. La plus lente adsorption à l'interface des complexes peut être expliquée par un rayon hydrodynamique plus important et donc une viscosité plus importante de la solution. Tous ces phénomènes ne sont pas forcément négatifs et on peut aussi obtenir des synergies. C'est le cas par exemple pour le système gomme arabique/globuline de pois. Le coacervat formé par ces deux polymères fait décroître la tension de surface par rapport à la protéine seule. On observe également que le coacervat se fixe plus fortement et plus rapidement à l'interface que la protéine ou la gomme considérées seules (137).

On peut donc voir qu'il y a deux cas de figure possibles. On peut envisager la formation de complexes en solution qui vont ensuite migrer vers l'interface (couche mixte) ou bien la formation d'un film protéique à l'interface sur lequel le polysaccharide va venir se greffer (multicouche). Ces deux mécanismes vont avoir pour résultat des structures de film différentes et par conséquent des caractéristiques différentes. Dans le cas de la couche mixte, on observe une diminution du déclin de la tension de surface ainsi qu'une viscoélasticité dilatationnelle plus importante que pour la protéine seule. Le système avec couche mixte donne également un film interfacial plus résistant que le système multicouche (138).

Il est également possible de déclencher la complexation d'un polysaccharide et d'une protéine en faisant appel à la coacervation. En effet, en amenant le pH à la bonne valeur, les couples protéine-polysaccharide compatibles vont subir une coacervation ionique. Cela peut permettre de renforcer l'interface air-eau dans le cas de mousse par exemple (139).

Il peut donc y avoir un intérêt à avoir un système mixte à l'interface suivant les caractéristiques finales voulues pour un produit à formuler. Le formulateur doit alors bien tenir compte des phénomènes présentés avant pour ne pas se heurter à des comportements non voulus.

4.3.2. Dans le cas d'une compatibilité thermodynamique limitée

Le cas d'un système qui comporte le mélange d'une protéine et d'un polysaccharide dans le cas d'interactions attractives est le cas « simple ». Lorsque les interactions ne sont plus attractives mais répulsives, la situation se complexifie et on peut avoir affaire à trois phénomènes différents :

- 1) Le polysaccharide, s'il possède une activité interfaciale, va pouvoir s'adsorber à l'interface en compétition avec la protéine,
- 2) Le polysaccharide, avec ou sans activité interfaciale, peut complexer avec la protéine via des liaisons hydrogènes ou des interactions électrostatiques,
- 3) A cause de l'existence de cette compatibilité thermodynamique limitée, le polysaccharide va venir concentrer la protéine adsorbée à l'interface (140).

L'accrochage du polysaccharide à l'interface peut avoir lieu par les mécanismes 1 et 2 en fonction de la nature du polysaccharide et du pH de la solution. Une fois que le polysaccharide est dans l'interface ou complexé à sa proximité, des effets de volume exclu peuvent avoir lieu, ce qui va avoir pour conséquence d'augmenter le potentiel chimique des molécules présentes (ce qui équivaut à une modification de l'activité thermodynamique de la protéine à l'interface). Cette modification de comportement à l'interface peut entraîner une augmentation de la pression interfaciale parce que la protéine se comporte comme un film plus concentré. C'est ce que montrent Carp et al. avec un système composé de gomme xanthane et de protéines de soja (141). Le fait d'ajouter de la gomme xanthane permet, à pH neutre, d'avoir un effet similaire à celui observé en augmentant la concentration en protéine. Nous avons pu voir dans la section précédente que certains polysaccharides pouvaient avoir une activité interfaciale tandis que d'autres non. Ces deux catégories de polysaccharides vont donc se comporter différemment à l'interface. Des mécanismes différents vont être impliqués et c'est pourquoi ces deux cas vont être traités séparément.

4.3.2.1. Le cas des polysaccharides ayant une activité interfaciale

Dans le cas où le polysaccharide possède une activité interfaciale, il peut y avoir compétition entre celui-ci et la protéine pour s'adsorber à l'interface. Le PGA a déjà montré des comportements de compétition avec les protéines pour l'interface. Dans un système qui comporte PGA et protéine, les deux polymères peuvent saturer l'interface par eux-mêmes (au-delà d'une certaine concentration en solution, respectivement 0.5 et 2 % en masse). Cette compétition va forcément influencer la pression de surface de manière directe et indirecte. En effet, la protéine, qui est l'espèce la plus tensioactive, va être déplacée de l'interface, ce qui va directement modifier la pression de surface (142). Plus le PGA est estérifié, plus son comportement compétitif sera important. Cela peut être cohérent avec le fait qu'augmenter

le degré d'estérification augmente l'hydrophobie du PGA, qui va donc avoir davantage tendance à se déplacer vers l'interface.

4.3.2.2. Le cas des polysaccharides sans activité interfaciale

Dans le cas des polysaccharides qui ne possèdent pas d'activité interfaciale, les choses se déroulent de manière différente. Il y a deux possibilités pour que le polysaccharide participe quand même à l'interface. La première possibilité est via une complexation avec la protéine. Malgré une compatibilité thermodynamique limitée, il est possible que les protéines et les polysaccharides interagissent entre eux via des interactions électrostatiques faibles entre des patches chargés sur leur squelette. La seconde possibilité est via des phénomènes de volume exclu (112).

La densité de charge du polysaccharide semble jouer un rôle important dans la solubilité du complexe protéine/polysaccharide formé (143). En effet, pour éviter la présence de coacervation complexe il faut que le polysaccharide porte une charge nette suffisamment importante ou bien qu'il porte une quantité suffisante de parties sucres non chargées (et donc bien solubles). Ce comportement qui a lieu dans la solution peut avoir un effet sur le comportement de l'interface. De plus, Ropers et al. ont montré que plus le polymère portait une densité de charge importante, plus les protéines avaient du mal à former une couche compacte à l'interface, ce qui entraîne un retard dans l'augmentation de la pression de surface (144).

Il existe plusieurs illustrations de ces phénomènes dans la littérature. Par exemple, les interactions associatives entre les protéines de petit-lait (Whey Protein Isolate, WPI) et la gomme xanthane (XG) à pH 7 sont mises en avant par des études du comportement rhéologique d'une mixture de WPI et de gomme xanthane. Une synergie peut être détectée entre la WPI et la XG car des effets importants sont mesurés sur la tension de surface. En effet la tension de surface diminue largement entre un ratio WPI/XG à 8 et un ratio à 2 (145).

Pour résumer cette partie sur les interactions entre protéines et polysaccharides à l'interface, voici un schéma qui reprend les principaux éléments expliqués ci-dessus.

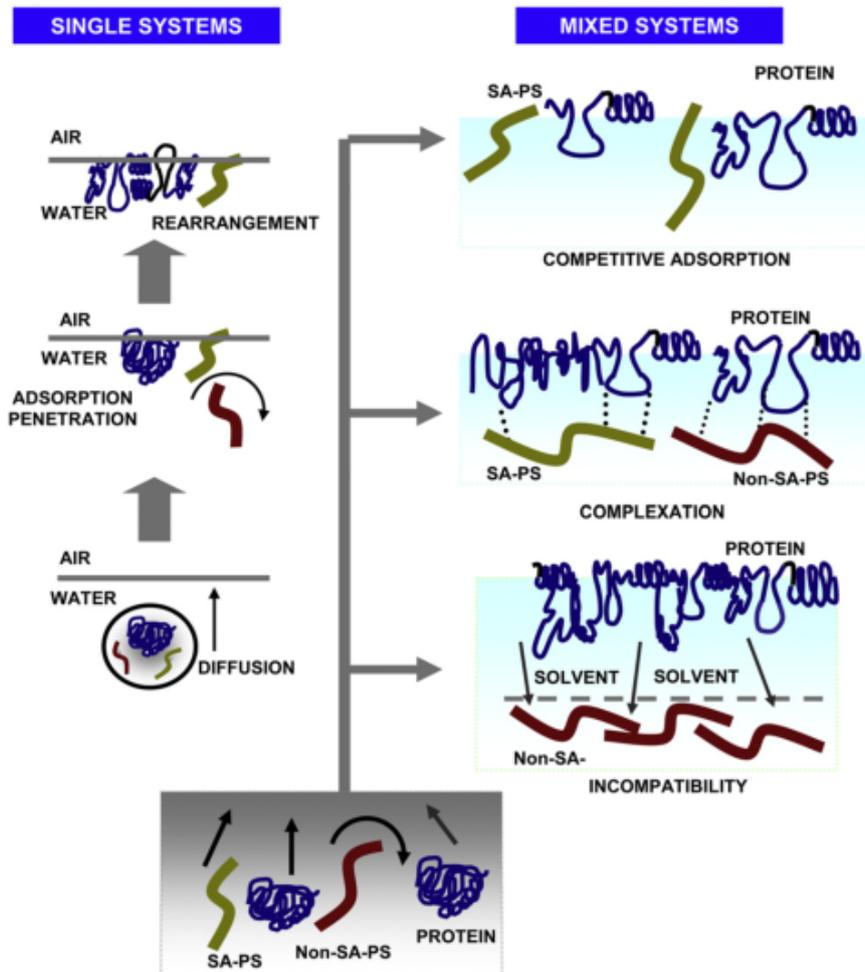


Figure 10 : Schéma récapitulatif des interactions entre protéines et polysaccharides en solution (112).

C. Série de Hofmeister

1. Introduction

Les ions de la série de Hofmeister sont étudiés depuis de nombreuses années pour essayer de comprendre leur comportement et leur mécanisme d'action. Malgré de nombreuses études, les effets de ces ions ne sont toujours pas bien compris.

En 1888, Hofmeister publie une étude de l'influence des ions sur la solubilité des protéines de blanc d'œuf en solution (146). Il arrange les ions en fonction de leur efficacité. La Figure 11 montre une liste non exhaustive de quelques ions dans ce classement. On peut remarquer que les anions et les cations sont classés de manière séparée. La première étude de Hofmeister consiste à mesurer la solubilité des protéines d'œuf en fonction de la nature de l'électrolyte utilisé. Hofmeister remarque des comportements différents selon le sel utilisé. Certains ions vont faciliter la solubilisation des protéines (« salting in ») tandis que d'autres vont avoir tendance à en baisser la solubilité (« salting out »).

THE HOFMEISTER SERIES											
KOSMOTROPIC	STABILIZING (SALTING-OUT)			DESTABILIZING (SALTING-IN)			CHAOTROPIC				
Anions:	F ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	CH ₃ COO ⁻	Cl ⁻	Br ⁻	I ⁻	CNS ⁻			
Cations:	(CH ₃) ₄ N ⁺	(CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Cs ⁺	Li ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Ba ²⁺	

Figure 11 : Classification de Hofmeister pour quelques ions (beaucoup d'autres ont été étudiés depuis) (239).

De nombreuses études ont été faites sur ce sujet de manière à expliquer le mécanisme d'action des ions sur les protéines. Plusieurs courants de pensée se dégagent de ces études, mais à l'heure actuelle, la communauté scientifique ne sait toujours pas vraiment expliquer ce phénomène clairement (147). Une tendance en ressort cependant, les anions ont un effet plus important que les cations (146).

2. Effets sur la structure de l'eau

Dans un premier temps, il a été pensé que les ions avaient un effet sur la structure de l'eau dans laquelle les protéines étaient dissoutes. Plutôt qu'affecter directement les molécules d'eau, les ions auraient une influence sur leur organisation dans l'espace en affectant les liaisons hydrogènes qui les unissent (148). En effet, il était pensé que les ions en solution pouvaient émettre un champ électrique de longue portée (sur une distance de 30Å, soit un diamètre d'environ 11 molécules d'eau) (149). Il était pensé que ce champ électronique était assez puissant pour orienter les dipôles des molécules d'eau. Cependant les techniques

actuelles de neutrons et de rayons X ont permis de démontrer que ce n'était pas le cas. Le champ électrique provenant des ions n'est pas assez puissant pour perturber les liaisons hydrogènes présentes entre les molécules d'eau (150).

Une autre explication des effets de sels sur la structure de l'eau serait en lien avec les sphères d'hydratation des ions. C'est à ce moment qu'apparaissent les termes de chaotrope (qui casse la structure de l'eau) et de kosmotrope (qui favorise la formation d'une structure) (151). Il est cependant montré maintenant que les ions n'ont pas vraiment d'effet sur les molécules d'eau en dehors de la première couche d'hydratation (ce qui est par conséquent de très faible portée et ne peut avoir d'effet sur la structure de l'eau) (147,152). Bakker propose alors à ce moment de ne pas considérer les solutions aqueuses salines comme des liquides homogènes mais plutôt comme des suspensions colloïdales avec des particules formées par les ions et leur première couche d'hydratation. Les petits ions fortement hydratés sont plutôt des kosmotropes. A l'inverse, les gros ions faiblement hydratés font généralement partie des chaotropes (151). La limite entre ces deux comportements dans la classification de Hofmeister se situerait aux alentours de NaCl, sel qui, même à de fortes concentrations, n'aurait pas d'effet vraiment important (153).

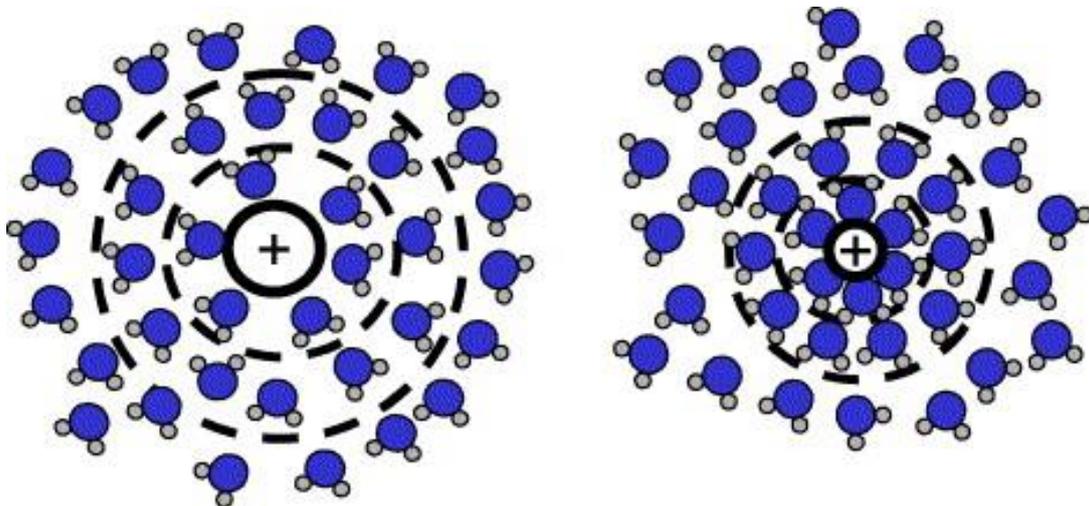


Figure 12 : Représentation des sphères d'hydratation théoriques autour des ions (extrait de 153).

3. Approche thermodynamique

En utilisant les lois de la thermodynamique et l'équation de Setschenow, Pegram et Record (154) ont montré que l'addition d'un sel dans une solution allait avoir une influence sur le composé en solution en fonction de sa concentration locale. En effet, ils avancent que le composé est affecté si la somme locale des concentrations en anions et cations dans l'eau d'hydratation du composé dissous est différente de leurs concentrations dans la solution. Si la somme des concentrations locales est plus forte que dans la solution, le sel améliore la solubilité du composé. Dans le cas contraire, le sel va diminuer la solubilité du composé.

Equation de Setschenow :

$$\log \frac{S_i^0}{S_i} = K C_s \quad (2)$$

avec S_i^0 la solubilité du composé dans l'eau pure, S_i la solubilité du composé dans la solution saline, K le paramètre empirique de Setschenow et C_s la concentration molaire de l'électrolyte (155).

4. Interactions entre ions et molécules

Une autre théorie pour expliquer l'effet des ions dans la série de Hofmeister se penche sur les interactions entre les ions chargés et les différents groupements présents sur les molécules solubilisées. En effet, les ions sont des particules chargées et peuvent donc interagir avec des groupements chargés ou polaires. C'est le cas par exemple avec des ions alcalins (type Na^+ ou K^+) avec les groupements acides carboxyliques de l'acide palmitique, étudiés par Tang et Allen (156). Ils montrent que ces deux ions ont des affinités de liaison avec les acides carboxyliques différentes. En temps normal, à pH neutre, tous les acides carboxyliques sont protonés et la déprotonation ne peut avoir lieu qu'à pH basique. Cependant, en présence d'ions, la déprotonation peut être initiée via deux mécanismes. Dans un premier temps, il est possible que la déprotonation se fasse par des interactions électrostatiques de longue portée entre le cation hydraté et le groupe acide carboxylique. Dans un second temps il est possible d'avoir une complexation entre l'ion non hydraté et le groupement. Il semble alors que Na^+ ait plus tendance à agir selon le premier mécanisme tandis que K^+ agirait selon le second. Ces

différences de comportement pourraient être expliquées par les différences qu'ont les ions entre leur hydratation, leur charge de surface et leur rayon hydrodynamique. Les auteurs soulignent le fait que K^+ se lie beaucoup plus fortement que Na^+ car il est plus enclin à former des complexes avec les COO^- .

5. Polarisabilité des ions

Plus récemment encore, une autre théorie a émergé, celle de la polarisabilité des ions. En effet tous les ions ont un nombre d'électrons différent et, par conséquent, une propension à se polariser différente. Par exemple, l'ion Br^- avec 80 électrons va avoir plus de chance de se polariser comparé à l'ion Ac^- qui a approximativement la même densité électronique que l'eau. On peut s'attendre par la même occasion à ce que la polarisabilité des ions varie dans la série de Hofmeister. Cette capacité à se polariser est ensuite reliée au potentiel ionique de dispersion. En général, un ion a une polarisabilité différente de celle des molécules d'eau qui l'entourent et par conséquent subit un potentiel de dispersion vraiment spécifique à l'approche d'une interface (157). Pour de fortes concentrations en sel, là où les potentiels électrostatiques sont pour la majeure partie écrantés, ce potentiel de dispersion ionique domine les interactions (158). Cette théorie vient en fait s'ajouter à la théorie des couches d'hydratation de l'eau pour la compléter. Les auteurs trouvent alors que les effets spécifiques de sel peuvent être mieux expliqués avec cette théorie complétée (159).

Zhang et al. montrent les effets des sels de Hofmeister sur un polymère en solution, le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM). Leur démonstration va dans le même sens que le potentiel ionique de dispersion (151). Trois mécanismes sont mis en avant pour expliquer les effets des sels sur la solubilisation du PNIPAM en solution. Le premier mécanisme implique que les anions apportent une polarisation aux molécules d'eau impliquées dans des liaisons hydrogènes avec le PNIPAM. Le second mécanisme indique que les ions pourraient interférer avec des liaisons hydrophobes en jouant sur la tension de surface des cavités au sein du polymère. Enfin, le dernier mécanisme implique que les anions se lient directement à la molécule. Les deux premiers mécanismes devraient conduire à un salting out du polymère tandis que le dernier entraînerait un salting in.

6. Couple d'ions

Bien qu'il soit acquis que les anions ont un effet plus important que les cations, cela ne veut pas dire que les cations n'ont aucun effet. Les espèces ioniques doivent être considérées toujours par deux et la modification de l'un peut entraîner un changement de comportement de l'autre (160). Par exemple, le fait de changer l'anion permet de changer le classement des cations dans la série de Hofmeister. Xie et Gao ont montré que l'intensité des effets des cations était modifiée en fonction de l'anion qui joue le rôle du contre-ion (161). Ils ont remarqué que l'ordre des cations dans la série de Hofmeister avec comme anion Cl^- était $\text{Na}^+ > \text{K}^+ \approx \text{Li}^+$ tandis que dans le cas de I^- comme anion, l'ordre devient $\text{K}^+ \approx \text{Na}^+ > \text{Li}^+$. Ces effets sont montrés en mesurant les effets sur la tension de surface à l'interface eau/air.

Il a été montré que les ions pouvaient avoir une influence sur la tension de surface d'une interface eau/air. Cette propriété serait liée à la capacité des ions à dénaturer les protéines en solution. Un ion capable de se lier à la protéine et donc de se trouver à son interface, sera également capable de se trouver à l'interface eau/air (162). Les auteurs ont mesuré l'incrément de tension de surface (Surface Tension Increment, STI) des sels de Hofmeister et tous ont un STI positif. Comme dit précédemment, les anions qui ont tendance à favoriser la déstabilisation des protéines en solution en réduisant l'exposition de la protéine à l'eau sont aussi ceux qui ont le plus grand STI. A l'inverse, les anions avec les plus petits STI sont ceux qui favorisent la solubilisation des protéines (163).

La densité surfacique de charge des ions diminue de Li^+ à Na^+ à K^+ . Les ions ont la même charge mais la taille de l'ion change de manière importante. Les auteurs ont mesuré la distance entre l'ion et l'atome d'oxygène de la molécule la plus proche. Dans le cas de Na^+ , la distance avec l'oxygène le plus proche est plus courte que la distance oxygène-oxygène dans l'eau, ce qui indique que Na^+ est fortement hydraté. Dans le cas de K^+ , c'est l'inverse, la distance oxygène- K^+ est plus grande que la distance oxygène-oxygène dans l'eau, ce qui traduit une faible hydratation de l'ion. Il y a donc un changement de comportement entre Na^+ et K^+ (150).

Une forte hydratation (kosmotrope) est associée avec une forte orientation du solvant tandis qu'une faible hydratation (chaotrope) de l'ion n'est associée avec aucune orientation du solvant. De cette manière, une molécule d'eau à proximité d'un chaotrope va avoir tendance à se déplacer plus rapidement que l'eau de la solution (164).

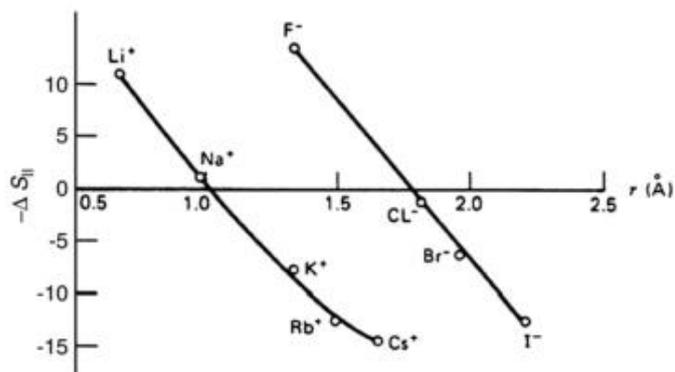


Figure 13 : Entropie de l'eau proche d'un ion moins l'entropie de l'eau pure ($K^{-1}mol^{-1}$) en fonction du rayon des ions (\AA). Des valeurs positives de DS_{II} (partie inférieure) indiquent que l'eau est plus mobile que dans le bulk. Des valeurs négatives (partie supérieure) indiquent que l'eau est moins mobile que dans le bulk. Les kosmotropes sont dans la partie supérieure alors que les chaotropes sont dans la partie inférieure (165).

Il peut donc y avoir une différence de comportement entre un sel formé de deux ions avec des propriétés similaires et un sel formé de deux ions ayant des propriétés différentes. On peut donc attendre un comportement différent entre KCl et LiCl par exemple. Ainsi, deux ions de charge opposée qui ont la même affinité pour l'eau vont avoir tendance à rester ensemble tandis que deux ions de charge opposée qui n'ont pas la même affinité pour l'eau vont avoir tendance à se séparer (165).

7. Approche de Jones-Dole

Une autre approche pour mesurer l'impact des ions de la série de Hofmeister est de réaliser des mesures de viscosité des solutions salines. Cette mesure peut se faire facilement en mesurant par exemple l'écoulement de la solution à travers un petit trou au fond d'un tube. Les résultats de cette mesure peuvent être corrélés avec un polynôme du second degré en fonction de la concentration en sel :

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + Ac^{\frac{1}{2}} + Bc \quad (3)$$

Avec η la viscosité de la solution saline, η_0 la viscosité de l'eau pure à la même température, A un terme électrostatique (qui est généralement égal à 1 pour des concentrations en sel modérées) et B qui est une mesure directe de la force des interactions entre ion et eau par rapport aux interactions eau-eau. Le coefficient B est appelé coefficient de viscosité de Jones-Dole. Ce coefficient sépare les ions en deux groupes, ceux avec un coefficient positif (pour les ions fortement hydratés, kosmotropes) et ceux avec un coefficient négatif (pour les ions faiblement hydratés, chaotropes) (165,166).

Cations	B	Anions	B
Mg ²⁺	0.385	PO ₄ ³⁻	0.590
Ca ²⁺	0.285	CH ₃ CO ₂ ⁻	0.250
Ba ²⁺	0.22	SO ₄ ²⁻	0.208
Li ⁺	0.150	F ⁻	0.10
Na ⁺	0.086	HCO ₂ ⁻	0.052
K ⁺	-0.007	Cl ⁻	-0.007
NH ₄ ⁺	-0.007	Br ⁻	-0.032
Rb ⁺	-0.030	NO ₃ ⁻	-0.046
Cs ⁺	-0.045	ClO ₄ ⁻	-0.061
		I ⁻	-0.068
		SCN ⁻	-0.103

Figure 14 : Valeurs des coefficients de Jones-Dole pour les anions et les cations courants (165).

D. Microencapsulation : techniques et utilisations

L'encapsulation consiste à emprisonner une substance dans une capsule. Cette capsule peut être de différentes matières, différentes tailles et différents aspects. L'encapsulation a de nombreuses applications. En effet, en encapsulant une substance il est possible de la protéger des agressions extérieures (pH, oxydation, lumière...) (167,168), de faciliter sa manipulation (en encapsulant un liquide, on obtient alors des particules solides), de masquer un goût ou une odeur (169), de la rendre soluble ou dispersible (en encapsulant une substance hydrophobe dans une capsule hydrophile) (170) ou encore de contrôler la libération de cette substance. Cette liste n'est pas exhaustive et d'autres exemples peuvent être facilement trouvés dans la littérature.

1. Domaines d'utilisation

L'encapsulation, et en particulier la microencapsulation, est présente dans de nombreux domaines industriels tels que la pharmaceutique, l'agriculture, l'agroalimentaire ou la cosmétique. Dresser une liste exhaustive de toutes les utilisations serait impossible donc quelques exemples pour chaque domaine seront présentés ici.

1.1. Domaine pharmaceutique (171)

L'intérêt principal de l'encapsulation dans le domaine de la pharmaceutique est la libération contrôlée ou retardée de principes actifs. On retrouve par exemple du chlorure de potassium encapsulé dans le cadre carences en potassium (DIFFU K®) et d'autres spécialités telles que PARAPSYLLIUM®, PENTASA® ou encore RISPERDAL CONSTA® CP. Le développement de produits contenant des protéines ou des peptides encapsulés destinés à la voie injectable est de plus en plus important (DECAPEPTYL® CO, ENANTONE® CP, SOMATULINE® CP, SANDOSTATINE® CP). Des applications existent aussi pour des médicaments destinés à l'inhalation.

1.2. Domaine agroalimentaire

Dans les produits agroalimentaires actuels, la tendance est au naturel. Cela implique l'utilisation de produits souvent fragiles, il est donc nécessaire de les protéger. C'est le cas des substances fonctionnelles telles que les arômes, les vitamines, les antioxydants... qui sont très sensibles au stress environnemental pendant la confection de l'aliment mais aussi sa consommation. Le fait de les encapsuler permet alors de les isoler du milieu extérieur et de réduire les dégradations. Cela permet également de libérer les substances au bon endroit (bouche, estomac, intestin) en passant toutes les conditions, parfois très agressives, du tube digestif sans être altérées (172).

1.3. Domaine de l'agriculture

La principale application de l'encapsulation dans le domaine de l'agriculture est pour des questions de sécurité. En effet, les produits phytosanitaires sont souvent toxiques et leur manipulation n'est pas aisée (173). Le fait de les encapsuler permet de diminuer leur toxicité et de par conséquent de faciliter leur manipulation. Le fait d'encapsuler ces produits permet également d'augmenter leur efficacité en contrôlant leur libération dans le temps et dans le milieu (174).

1.4. Domaine cosmétique

Dans le domaine des cosmétiques, de nombreux produits sont concernés par l'encapsulation, parmi lesquels les shampooings, les déodorants, les sprays et autres produits de soin. L'encapsulation est principalement utilisée pour améliorer la stabilité de ces produits en limitant les incompatibilités entre les actifs. Cependant, d'autres utilisations peuvent être de masquer une forte odeur ou de protéger des substances de l'humidité atmosphérique ou de l'oxydation.

Pour des applications en maquillage, les microsphères de nylon sont très appréciées pour leur ressenti sur la peau et leur bonne adhérence. De plus leur non réactivité chimique leur permet d'encapsuler une large gamme d'actifs qui incluent des vitamines, des filtres solaires, des rétenteur d'humidité, des parfums et autres actifs (175).

Dans le cadre de cette étude, les particules développées se limitent aux domaines de la cosmétiques, de la pharmaceutique et aux applications biomédicales.

2. Structures et morphologies

La différence entre microencapsulation et nano-encapsulation réside dans la taille des particules obtenues à la fin du procédé de fabrication. Pour ce qui concerne ce travail, seul la microencapsulation sera traitée. Il existe de nombreuses méthodes pour la fabrication de microparticules et la difficulté est de choisir laquelle est la plus adaptée au système étudié. Il faut pour cela prendre en compte la substance à encapsuler mais également le matériau qui va servir à l'encapsulation et s'assurer que les deux sont compatibles (chimiquement, physiquement) (168). Le choix de la méthode de fabrication des microparticules va directement influencer leur structure. Plusieurs structures communes peuvent être rencontrées, la plupart d'entre elles ayant une forme sphérique.

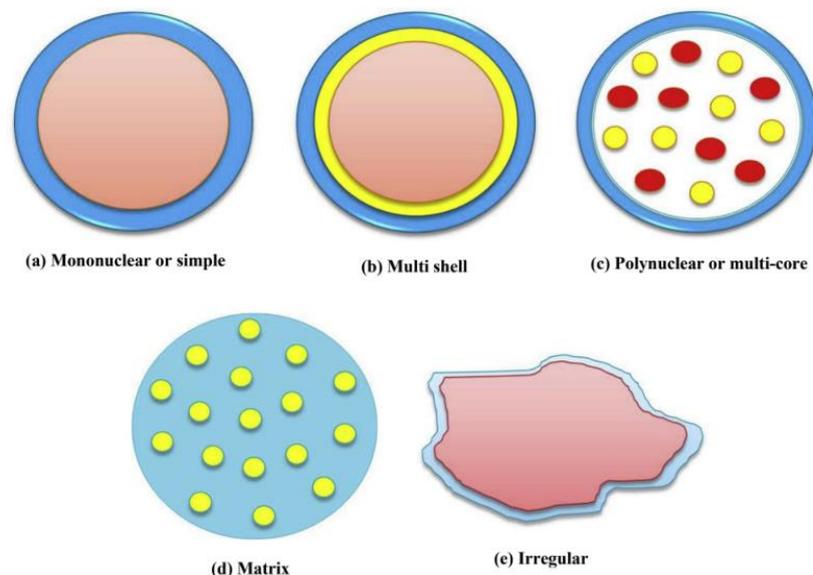


Figure 15 : Représentations des différents types de particules que l'on peut obtenir selon la méthode utilisée (169).

Les particules les plus simples sont celles constituées d'un cœur qui contient la substance active et d'une membrane unique et continue qui le recouvre (on parle de structure mononucléaire ou vésiculaire). Une variante de cette structure serait d'avoir une seconde

membrane entre la première et le cœur. Il est également possible d'observer des particules qui possèdent plusieurs cœurs avec une ou plusieurs substances actives à l'intérieur (structure polynucléaire). Les particules matricielles sont courantes également et consistent en une particule continue qui contient en son sein, uniformément distribuée, la substance active. Enfin il est possible de rencontrer des particules de forme irrégulière (169). La forme et la structure des particules vont jouer sur la manière et la vitesse de libération de la substance encapsulée.

3. Les méthodes d'encapsulation

Les méthodes de fabrication de microparticules sont divisées en trois grandes catégories : les méthodes physiques, les méthodes physico-chimiques et les méthodes chimiques. Quelques méthodes seront détaillées pour chaque catégorie.

3.1. Méthodes physiques

3.1.1. *Spray drying*

Le spray drying ou « nébulisation – séchage » consiste en une atomisation d'un liquide en une fine poudre grâce à un injecteur et une source d'air chaud. Cette technique peut être découpée en trois étapes principales et nécessaires. La première est une homogénéisation du liquide initial en petites gouttelettes grâce à un injecteur. La seconde est le séchage des particules (évaporation du solvant) grâce à un courant d'air plus ou moins chaud, qui sert également de fluide porteur. Enfin, la dernière étape est celle de la récupération des particules dans le collecteur à l'aide d'un cyclone ou d'un filtre (176).

La partie liquide de ce processus contient à la fois le matériau à encapsuler et un autre matériau qui sert à former la structure solide de la particule lors de l'évaporation du solvant. Cette partie liquide peut être une émulsion, une solution ou bien une suspension (177). Dans de nombreux cas, des préparations à base d'eau sont utilisées, le matériau utilisé doit donc y avoir une bonne solubilité. Il existe cependant aujourd'hui des appareillages qui rendent possible l'utilisation de polymères en phase solvant volatil. De la même manière, il faut que le matériau choisi ait une faible viscosité à forte concentration (pour passer facilement dans l'atomiseur), soit capable de former efficacement une émulsion, et ait des propriétés

filmogènes (167). Les caractéristiques des particules obtenues vont dépendre de nombreux paramètres tels que la température de l'air chaud, le débit d'air chaud, la vitesse d'apport en phase liquide, la taille de l'injecteur...(178). L'étape de séchage peut être réalisée de plusieurs manières. Le sens du courant d'air chaud peut avoir une influence sur les particules mais aussi sur la substance encapsulée. On trouve alors le co-courant, le contre-courant et le courant mixte. La méthode la plus utilisée est celle du co-courant car elle permet de ne pas endommager les substances thermosensibles. En effet, l'endroit où l'air est le plus chaud est proche de l'atomiseur. A cet endroit, une majeure partie de la chaleur va être dissipée pour favoriser l'évaporation du solvant et ne va donc pas endommager la substance encapsulée (179).

Les matériaux utilisés pour former la partie solide de la particule peuvent être de différentes natures mais les plus utilisés sont les polysaccharides comme par exemple les maltodextrines ou la gomme arabique mais aussi des protéines comme les protéines de lait, la gélatine...(180,181).

Le spray drying est souvent utilisé pour l'encapsulation de composés antioxydant dans l'industrie alimentaire. De nombreuses études sont disponibles dans la littérature pour souligner l'importance de cette technique. Plusieurs paramètres sont étudiés de manière à comprendre leur importance sur le résultat obtenu comme la nature du matériau de membrane (180) ou la température d'entrée de l'air chaud (182).

Cette technique possède de nombreux avantages. En effet, elle est considérée comme rapide, peu chère, reproductible et facile à mettre en place à grande échelle (183), surtout en comparaison à d'autres techniques comme la lyophilisation, le lit fluidisé ou le séchage par détente (184). De plus, les particules obtenues ont un très faible taux d'humidité et ont généralement une haute stabilité chimique, physique et microbiologique (185). Plusieurs désavantages sont cependant à noter. Le fait d'avoir un courant d'air chaud peut endommager certaines molécules fragiles et la technique n'est donc pas adaptée à tous les composés (carotène, vitamine C, colorant, arôme) (184). De plus, la taille des particules n'est pas facile à contrôler et le procédé peut conduire à une forte polydispersité (186).

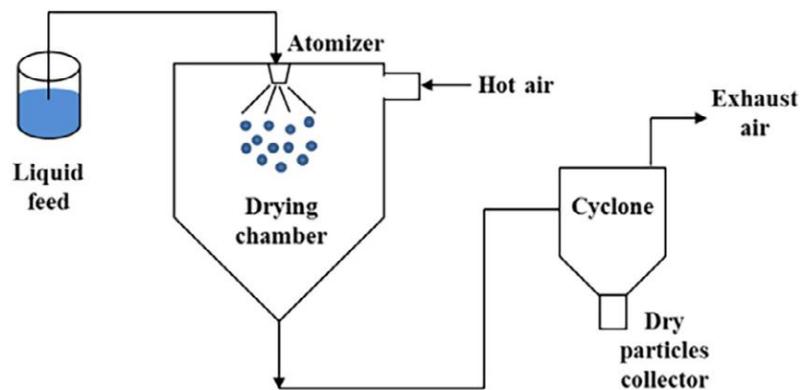


Figure 16 : Représentation schématique du spray drying (167).

3.2. Méthodes physico-chimiques

3.2.1. Coacervation

La coacervation est une technique qui repose sur une séparation de phase liquide-liquide entre un ou des polymères en solution aqueuse, initiée par des interactions électroniques, formation de liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes ... (187). Le résultat de cette séparation de phase est une phase fortement concentrée en polymères, le coacervat, et une phase appelée solution d'équilibre. La force des interactions résultantes entre les biopolymères va dépendre de plusieurs facteurs tels que le type de biopolymère, le pH, la force ionique, la concentration des polymères ... (188).

Le procédé de coacervation peut être simple ou complexe en fonction du nombre de polymères en jeu dans le système (189). La coacervation simple n'implique qu'un seul type de polymère et l'ajout d'agents très hydrophiles dans la solution colloïdale, tandis que la coacervation complexe peut faire appel à deux ou plusieurs types de polymères pour la formation d'une paroi autour de la substance à encapsuler. Plus en détails, la coacervation complexe commence par la formation d'une émulsion en dispersant la substance à encapsuler dans une phase aqueuse qui contient le premier polymère. La seconde étape consiste en l'ajout d'une seconde phase aqueuse qui contient le second polymère de manière à former une couche autour de la substance à encapsuler par complexation. Cette complexation se fait

lors d'un changement de pH, de force ionique, de température ... Enfin, les particules obtenues peuvent être stabilisées en suivant un traitement de réticulation, un traitement thermique ou une désolvatation. Les complexes formés (solubles, insolubles ou agrégés) sont récupérés par centrifugation ou filtration et ensuite lavés avec un solvant approprié puis enfin séchés pour obtenir des particules solides. Les particules obtenues par coacervation complexe sont typiquement de structure mononucléaire, le cœur étant couvert d'une membrane uniforme (190,191).

Une grande quantité de polymères a été testée pour faire office de matériau de mur pour la coacervation simple ainsi que pour la coacervation complexe. Dans le cas de la coacervation simple, différents polysaccharides tels que la gélatine, l'alginate, le chitosan ou la cellulose ont été testés. Pour la coacervation complexe, le couple le plus courant est l'association gélatine-gomme arabique mais on trouve également les couples alginate-chitosan, albumine-gomme arabique et gélatine-carboxyméthyle cellulose (191).

Cette technique est largement utilisée pour l'encapsulation de substances lipophiles car le procédé s'y prête bien. On retrouve dans la littérature de nombreuses études avec comme exemples l'encapsulation d'huile de palme et de β -carotène (192), de lycopène (193), de vitamine E (194)... Malgré sa forte utilisation pour l'encapsulation de substances hydrophobes, cette technique est aussi adaptée pour les substances hydrophiles (195).

La technique de coacervation est avantageuse sur plusieurs points. Elle fait preuve d'une forte capacité d'encapsulation, elle se déroule à température ambiante, il y a peu de pertes par évaporation ou par dégradation thermique et elle permet le contrôle de la libération de la substance encapsulée. De plus, aucun matériel spécifique n'est nécessaire à sa mise en place et les conditions de préparation sont simples et non toxiques. En revanche, la complexité de la technique et le coût d'isolation des particules contrent un peu tous ces avantages (167).

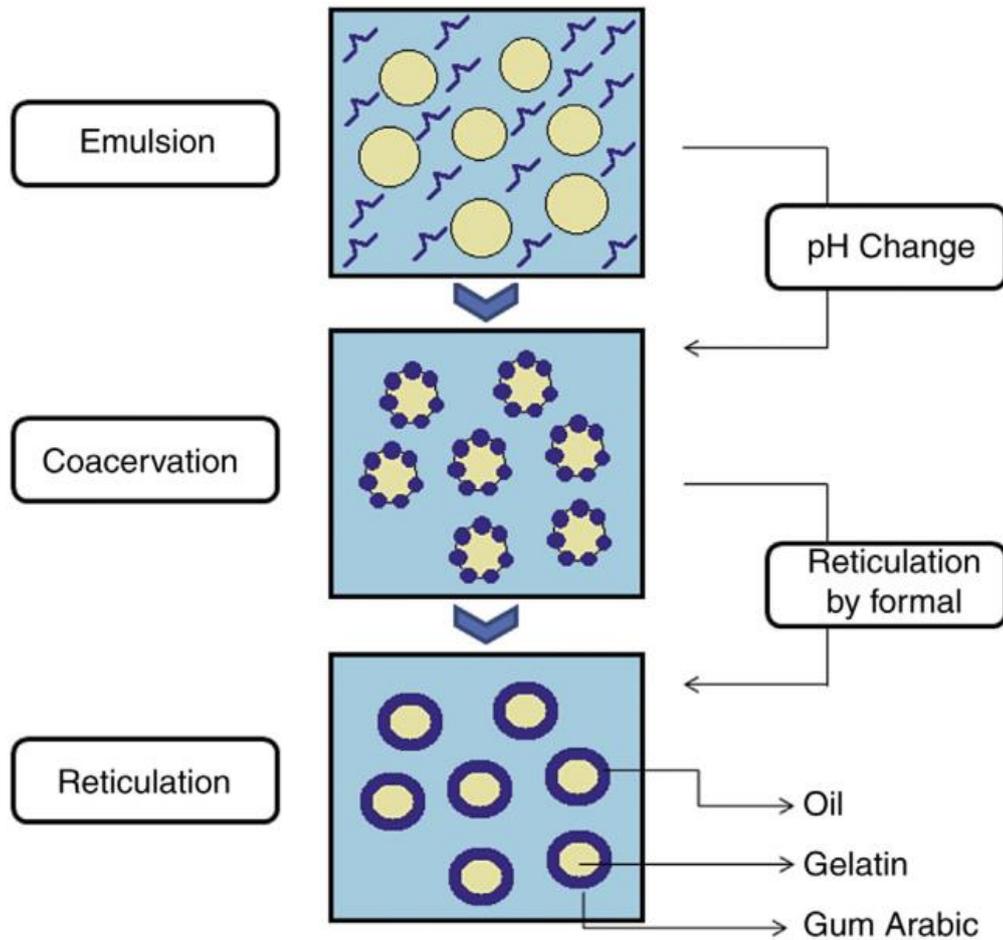


Figure 17 : Schéma du procédé de coacervation à partir de gélatine et de gomme arabique (extrait de 196).

3.3. Méthodes chimiques

3.3.1. Polycondensation interfaciale

La polycondensation interfaciale consiste en la formation d'une membrane à l'interface entre une phase aqueuse et une phase organique non miscibles entre elles. Chaque phase contient un monomère réactif bifonctionnel (hydrophile pour la phase aqueuse et hydrophobe pour la phase organique, et donc insolubles ou peu soluble dans l'autre phase) et une émulsion est formée. Les deux monomères vont diffuser vers l'interface et réagir pour former une membrane covalente polymérique. Ce type de réaction ne nécessite, en général, pas d'ajout de catalyseur et peut se réaliser à basse température. Cela fait que cette technique est (196)particulièrement adaptée pour la fabrication de microparticules. La qualité et la taille de

la membrane polymérique peuvent être optimisées en contrôlant les paramètres de fabrication tels que les concentrations en monomères, la température, la vitesse d'émulsification ou le temps de réaction (167,197).

Un exemple typique de cette méthode est la fabrication de microcapsules de nylon. Une phase organique (chloroforme/cyclohexane) qui contient un tensioactif (trioléate de sorbitan) et une phase aqueuse qui contient la substance à encapsuler et une diamine sont préparées séparément. Les deux phases sont ensuite émulsionnées dans un bain froid jusqu'à obtenir la taille de gouttelettes désirée. Dans le cas présenté, une seconde phase organique est ajoutée mais celle-ci contient un dichlorure d'acyle qui va permettre d'initier la réaction de polycondensation. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout d'un excès de phase organique. Les particules obtenues peuvent alors sédimenter et être récupérées pour être lavées dans une solution saline de manière à retirer les traces de solvant organique (197). Quatre familles de polymères ont été développées principalement, les polyamides, les polyuréthanes, les polyurées et les polyesters et plusieurs combinaisons de monomères sont possibles pour obtenir toute une gamme de caractéristiques pour la membrane (198).

Avec cette technique, la formation de la membrane à l'interface se fait par un mécanisme qui n'est pas encore totalement compris. La réaction commence à l'interface liquide et au fur et à mesure que la membrane se forme, le site de réaction se déplace vers le cœur. Deux cas de figure peuvent alors se présenter. Dans le premier cas, le polymère formé est soluble dans la gouttelette de phase dispersée. Le polymère va alors continuer de grandir tout en étant soluble, ce qui va avoir tendance à former une particule pleine (microparticule de type matrice). C'est par exemple ce qu'il se passe lors de la polymérisation interfaciale du bisphénol A avec du phosgène. Dans le cas où le polymère formé n'est pas soluble dans la phase dispersée, celui-ci va précipiter à l'interface et donc former une membrane autour de la gouttelette, ce qui va conduire à une capsule creuse (microparticule de type vésiculaire). Plus la réaction est longue, plus la membrane sera épaisse. Les capsules de nylon sont un bon exemple de ce mécanisme (199).

3.3.2. Réticulation interfaciale

Le principe de cette méthode repose sur un procédé très proche de la polycondensation interfaciale. La différence se trouve dans le fait que le monomère hydrosoluble est remplacé

par un oligomère ou un polymère (protéine, polysaccharide, polyphénol...). Une méthode d'encapsulation reposant sur cette technique a d'ailleurs été mise au point au laboratoire. Elle conduit à des particules plus stables et résistantes mécaniquement que les capsules préparées par polycondensation interfaciale, et sont biodégradables.

Par exemple, des microparticules à base de polyphénol (oligomère proanthocyanidique extraits de pépins de raisin, OPC PR) ont été produites. La réticulation des OPC PR se fait grâce au chlorure de téréphtaloyle et implique les groupements hydroxyphénoliques. Cette réaction conduit à la formation de liaisons esters. Les particules obtenues sont stables sur plus de 5 mois à 45°C et présentent une activité antioxydante intéressante en cosmétologie (13,200).

3.4. Méthodes de microencapsulation par transacylation

La méthode de microencapsulation par transacylation fait partie des méthodes dites chimiques. Celle-ci va faire l'objet d'une étude plus détaillée car elle est la base des travaux de cette thèse. En effet, toutes les microparticules préparées lors de cette étude ont fait appel à cette technique via un protocole mis au point par le laboratoire.

3.4.1. Les gels résultant de la transacylation

L'histoire de l'utilisation de la réaction de transacylation dans le but de former des gels remonte à 1955, année durant laquelle Henkel et Cie dépose un brevet pour une méthode de fabrication d'amides de l'acide alginique (201). Ils obtiennent ces amides en faisant réagir des esters de l'acide alginique avec des composés aminés. Il faut attendre quelques années de plus pour que cette réaction soit utilisée dans des domaines courants. En 1962, la réaction présentée avant est étendue et cette fois, les molécules comportant au moins deux fonctions amines sont considérées. Cette réaction est alors utilisée dans le domaine de la photographie où elle va servir à faire durcir des films lors d'un trempage dans des bains spécifiques alcalins (202).

En 1966, un autre brevet est déposé et celui-ci propose une méthode de modification de l'alginate d'alkylène glycol par un traitement basique doux. Sous des conditions adaptées, il est alors possible d'augmenter la viscosité des solutions et même, dans certains cas, d'obtenir

des solutions viscoélastiques ou bien des gels. L'alginate d'alkylène glycol peut être utilisé seul ou bien en mélange avec d'autres polymères tels que l'amidon ou l'alcool polyvinylique. Ces modifications de l'alginate sont utiles pour des applications dans la production de suspensions (par exemple certains sirops de fruits) ou comme agents de liaison ou de couverture dans les industries du papier ou de la production de nourriture pour poissons (203).

En 1970, McDowell décrit de nouvelles réactions possibles avec le PGA et leurs influences sur la viscosité des solutions en question. Les nouvelles réactions se font principalement avec l'amidon, la gélatine, les amines et l'alcool polyvinylique. Une augmentation de la viscosité des solutions est observée dans tous les cas. La nature de la réaction qui a lieu n'est alors pas clairement identifiée. L'auteur avance la thèse d'une forte réticulation au sein de la solution mais ne peut pas expliquer clairement l'origine de ce phénomène. Il avance également la thèse de la transestérification mais sans y croire vraiment (ce genre de réaction se fait normalement en milieu anhydre) (204).

Il faut attendre 1980 pour que la nature covalente entre le PGA et des protéines soit identifiée. Cela apporte beaucoup aux gels puisqu'un gel covalent sera beaucoup plus thermostable (le seul moyen de le liquéfier est de casser les liaisons covalentes) qu'un gel formé par des interactions électrostatiques par exemple (205). Des tests sont menés pour déterminer la capacité de plusieurs protéines à former des gels thermostables avec l'alginate de propylène glycol (gélatine, caséine, protéines de petit lait, albumine de blanc d'œuf et de la sérumalbumine bovine) et les conditions d'obtention d'un gel thermostable sont déterminées (206).

3.4.2. Le mécanisme et les conditions de la réaction de transacylation

La réaction de transacylation repose sur un transfert d'acyle entre un groupement ester et une fonction amine libre. Lorsque du PGA est impliqué, c'est ce dernier qui est porteur du groupe acyle tandis que la protéine sera la porteuse de la fonction amine libre. La réaction entre ces deux groupements conduit à la formation d'une liaison amide covalente et la libération de propylène glycol.

Le mécanisme de cette réaction repose sur une substitution nucléophile de l'ester avec la migration de l'acyle qui se fait de l'oxygène vers l'azote (O vers N). Pour que cette réaction puisse avoir lieu, il est nécessaire que le pH du mélange soit alcalin dans le but de créer le maximum de groupements aminés non ionisés sur la protéine, ce qui accélère la réaction (205,206).

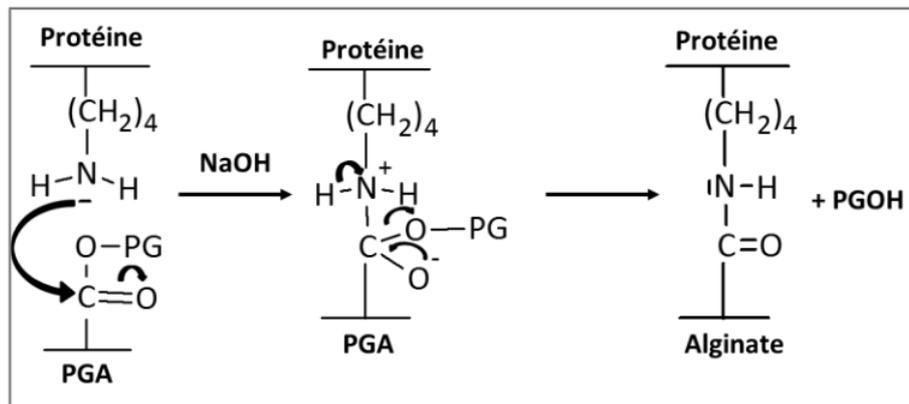


Figure 18 : Mécanisme de la réaction de transacylation.

Les conditions nécessaires à la formation de la liaison covalente, un pH alcalin compris entre 8 et 10, sont aussi à l'origine de plusieurs réactions secondaires qui peuvent être nocives pour le gel formé ou même pour les polymères de départ. Après alcalinisation, on peut observer les réactions secondaires suivantes :

- Une dégradation du PGA par la rupture des liaisons glycosidiques par β -élimination.
- Une saponification du PGA avec la formation de groupements carboxylates.
- Une dégradation de la protéine par dénaturation (destruction des ponts disulfures).

Pour que le système soit capable de former un gel, il faut donc que la vitesse de réaction de la transacylation soit plus importante que celle des réactions secondaires (204). Pour cela, les conditions de réaction peuvent être adaptées. La β -élimination est favorisée par les hautes températures, il conviendra donc de se placer à température ambiante ou refroidie. Il a été montré que l'hydrolyse ne concerne quasiment que les groupements esters primaires du PGA, ce qui laisse les groupements esters secondaires disponibles pour la transacylation. De plus, il est possible que la vitesse de la réaction de transacylation soit plus rapide que celle de

l'hydrolyse. Enfin, pour éviter la dégradation du gel une fois celui-ci formé par hydrolyse alcaline, il est nécessaire de le neutraliser (57).

La réaction de transacylation, bien que plutôt facile à mettre en œuvre, est malgré tout soumise à quelques contraintes, qui viennent majoritairement de la nature du polysaccharide. En effet, la première condition est que le polysaccharide doit être estérifié (si ce n'est pas le cas, le transfert d'acyle ne peut pas avoir lieu et aucun gel n'est formé). Cela se confirme par le fait que le remplacement du PGA par de l'acide alginique ne permet pas la formation d'un gel.

En revanche, le simple fait d'avoir un polysaccharide estérifié ne suffit pas à la faisabilité de la réaction. Certaines considérations doivent être faites par rapport à la structure et à la conformation des polysaccharides. Par exemple le fait de remplacer le PGA par des esters de pectates peuvent nécessiter des ajustements du protocole. En effet, il existe des différences dans la conformation des deux polysaccharides. En ce qui concerne les esters de pectates, quasiment tous les résidus sont liés entre eux par des liaisons glycosidiques diaxiales tandis que dans le PGA, seules les régions riches en guluronate sont agencées de cette manière tandis que les régions riches en mannuronates sont liées de manière di-équatoriale (207). Il faut donc tester les différents polysaccharides et adapter le protocole si possible.

Des simulations mathématiques ont permis de montrer que les régions riches en mannuronates étaient plus flexibles que les régions riches en guluronate et ces résultats ont par la suite été confirmés par des études de diffraction de la lumière et de viscosité (208,209). Ces observations mettent en avant le fait qu'une meilleure flexibilité (résultante des résidus liés par des liaisons di-équatoriales) permet d'avoir une meilleure réactivité due à une plus faible gêne stérique. Par conséquent, il semblerait que les pectates et les zones riches en guluronates du PGA soient moins réactifs que les régions mannuronates.

Cette hypothèse a été testée et validée par McKay, Stainsby et Wilson (207). Ils ont préparé des gels de PGA et de protéine avec des PGA de différentes sources et donc différents ratios mannuronate/guluronate (M/G). Ils ont trouvé une corrélation entre la rigidité du gel obtenu et la proportion de résidus mannuronates dans la structure du PGA. Plus il y a de résidus mannuronates dans la structure du PGA, plus le gel est rigide (même si le degré d'estérification est un peu plus faible).

Par la suite, il a été montré dans l'équipe qu'il était possible de fabriquer des microparticules par transacylation avec la pectine comme polysaccharide. La formation d'un gel covalent devient possible dès lors que le protocole est adapté. La présence de NaCl s'est révélée nécessaire. Les temps de réaction et les quantités de soude ajoutées ont été adaptés. Ces ajustements ont été mis en place par Imane Hadeef lors de sa thèse dans le laboratoire (1).

3.4.3. Caractéristiques des gels formés

Les gels formés par la réaction de transacylation ont plusieurs caractéristiques mesurables qui les rendent intéressants pour certaines utilisations. Les deux caractéristiques les plus importantes sont la fermeté et la stabilité thermique, mais on retrouve également la solubilité et la biodégradabilité qui peuvent être intéressantes pour des utilisations dans les domaines médicaux, alimentaires ou cosmétiques.

3.4.3.1. Fermeté

Les gels formés reposent sur la formation de liaisons covalentes, ce qui permet d'avoir un gel élastique mais qui ne s'écoule pas. La fermeté des gels obtenus dépend fortement de la concentration en PGA et en protéine dans la solution. Les gels les plus fermes sont obtenus avec le PGA et la gélatine (206).

Les gels formés avec des protéines globulaires ont tendance à être plus fermes en raison de la dénaturation de la protéine avant son mélange avec le PGA. Peu importe la nature de la protéine, le gel va rapidement perdre en viscosité s'il n'est pas neutralisé après fabrication. En effet, les réactions secondaires présentées précédemment sont responsables de cette dégradation (204).

3.4.3.2. Thermostabilité

Contrairement aux gels formés uniquement de gélatine, les gels à base de PGA et de gélatine sont stables en température (jusqu'à 100°C en chauffage court et jusqu'à 95°C pendant 6 heures). Une fois refroidi, le gel est toujours présent mais il est souvent moins ferme.

En ce qui concerne les basses températures, les gels à base de PGA et de gélatine ou de caséine supportent bien la congélation (-18°C pendant 2 jours). Après décongélation, il semble que la structure des gels ne soit pas modifiée mais qu'une légère perte en eau ait eu lieu (206).

3.4.3.3. Biodégradabilité

Le PGA n'est pas facilement dégradé puisqu'il n'est pas dégradé par les enzymes digestives humaines ni absorbé. Les gels formés à partir de PGA seront alors dégradés si l'autre biopolymère utilisé lors de la transacylation peut être dégradé, comme les protéines ou l'amidon. Cette dégradation se fera alors par la destruction des liaisons peptidiques par les enzymes (210). A titre d'exemple des essais de dégradation enzymatique ont été réalisés sur des gels gélatine/PGA avec la trypsine et la pepsine. Il est possible de mesurer l'efficacité de la dégradation en mesurant la quantité de groupements α -aminés libérés une fois que les liaisons peptidiques sont coupées. Il y a deux indicateurs colorés qui peuvent être utilisés pour ces mesures : la ninhydrine et l'acide trinitrobenzène sulfonique (210). La dégradation à la trypsine est quasi complète en 1 heure tandis que pour la pepsine, la dégradation est plus lente bien qu'elle soit quasi complète également. De plus, il est montré que le fait d'avoir un complexe avec le PGA ne gêne pas la dégradation de la protéine.

3.4.4. Méthodes d'encapsulation par transacylation (211)

Plusieurs variantes de l'utilisation de la transacylation pour la microencapsulation ont été développées par le laboratoire de manière à répondre à différentes problématiques. Il est alors possible de réaliser de l'encapsulation en milieu totalement aqueux, ce qui convient parfaitement à l'encapsulation d'organismes vivants, mais aussi de travailler en émulsion eau dans huile ou bien avec une méthode mixte.

3.4.4.1. Méthode en émulsion

Pour cette voie de fabrication, une émulsion eau dans huile est d'abord formée. La phase aqueuse contient les deux biopolymères et la phase organique un tensioactif. La réaction de transacylation est déclenchée à l'aide d'un agent alcalin qui va diffuser dans l'émulsion et former le réseau au sein des gouttelettes. Une fois le temps de réaction souhaité atteint, le milieu est neutralisé par l'ajout d'un tampon neutre.

Ce protocole peut être utilisé avec de nombreuses protéines comme la sérumalbumine, l'hémoglobine, des protéines végétales, l'ovalbumine... mais aussi des enzymes (immobilisation de catalase ou de phosphatase alcaline) tout en conservant une activité enzymatique (212). Cette méthode peut aussi être adaptée pour réaliser de l'encapsulation

de gouttelettes d'huile en émulsion double eau dans huile dans eau. La phase dispersante est constituée d'eau et contient les deux biopolymères. Les gouttelettes d'huile émulsionnées contiennent une phase aqueuse chargée en agent alcalin. La diffusion de l'agent alcalin de la phase organique vers la phase aqueuse extérieure va initier la réaction de transacylation à la surface des gouttelettes d'huile. Cette technique a été utilisée en cosmétique sous le nom de Cyclasphère® (BASF-BCS).

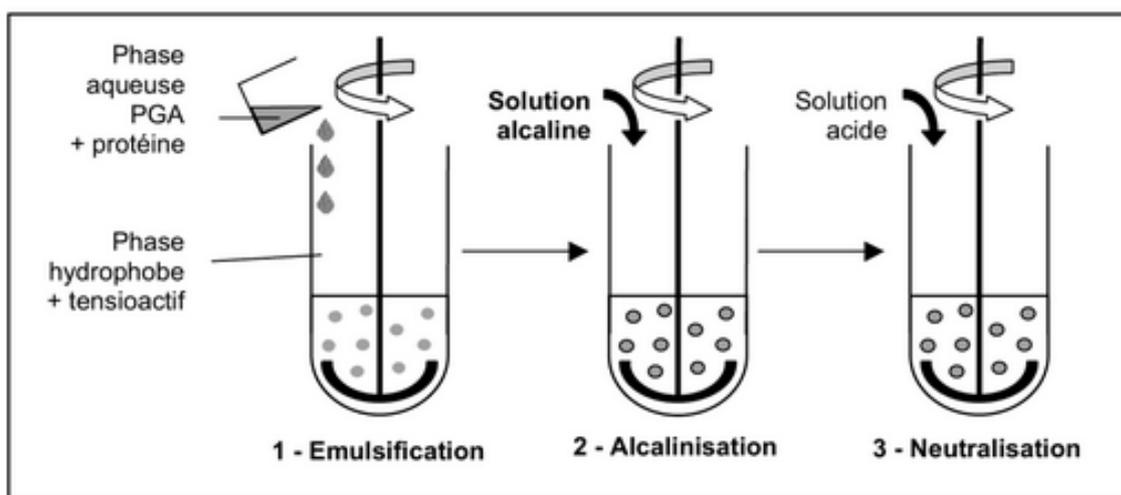


Figure 19 : Protocole de préparation de microparticules par transacylation en émulsion.

Dans la thèse, d'Imane HADEF, plusieurs axes recherche ont été envisagés. Le travail de thèse a commencé par étudier l'influence des propriétés physicochimiques des deux polymères (HSA et PGA) ainsi que des conditions de préparation sur les particules obtenues. Pour cela, les propriétés des solutions contenant les deux polymères ont été analysées en solution et à l'interface (viscosité, tension interfaciale...). Grâce à cette étude, un diagramme de phase du mélange HSA-PGA a pu être établi en se basant sur l'aspect microscopique des mélanges. Ensuite, des particules ont été préparées dans différentes conditions puis caractérisées pour établir le lien entre les propriétés physicochimiques de départ et les propriétés morphologiques et fonctionnelles des particules (taux de gonflement, structure interne et cinétique de libération de traceurs). Il a été montré que la structure interne des particules dépend de la concentration en polymères dans la phase aqueuse. A faibles concentrations, les particules présentent une structure dentelée, qui évolue progressivement vers la structure vésiculaire au fur et à mesure que la concentration en polymères augmente. Ces différences

de structure impliquent des différences de comportement. Les particules avec une structure interne dentelée ont tendance à beaucoup plus gonfler en présence d'eau et par conséquent, libèrent mieux le traceur que leurs homologues vésiculaires (213).

Un second axe de recherche du travail d'Imane HADEF était de remplacer le PGA par d'autres polysaccharides naturels. Dans un premier temps, des esters d'alginate ont été envisagés pour étudier l'influence de la nature de la chaîne de l'ester sur la faisabilité et les propriétés des particules. Il en ressort que les alginates d'alkyles sont peu solubles dans l'eau et ne conviennent pas pour la fabrication de microparticules. En revanche, les esters hydroxyalkylés d'alginate sont parfaitement adaptés et fonctionnent peut-être mieux que le PGA (214).

Dans un deuxième temps, d'autres polysaccharides naturels ont été utilisés tels que la pectine et l'acide hyaluronique. L'ajustement du protocole standard a permis l'obtention de particules avec ces deux polysaccharides.

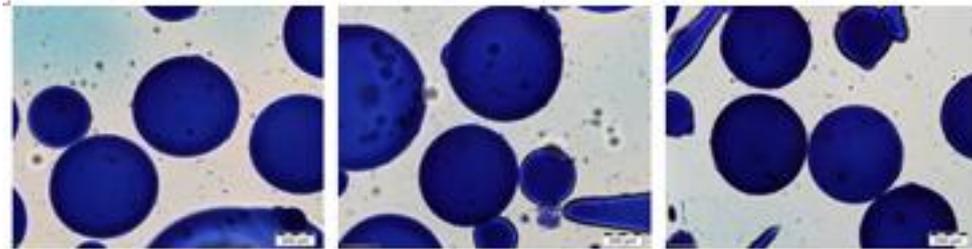


Figure 20 : Particules obtenues par transacylation en émulsion.

La réaction de transacylation peut également être appliquée à la réticulation de polyphénols. Dans ce cas, la réaction est une transestérification, et les conditions doivent être adaptées. Lors de la thèse d'Aude MUNIN, la préparation de microparticules à partir de polyphénols naturels a été mise au point (215). Cette voie de fabrication de particules présente deux possibilités : une transacylation interfaciale autour de gouttelettes huileuse ou bien une transacylation en émulsion au sein de gouttelettes aqueuses. Dans le premier cas, la liaison covalente est formée autour des gouttelettes d'huile au sein d'une émulsion par une réaction de transacylation, initiée par l'ajout d'acide. Cette technique ne fonctionne qu'avec certaines huiles très hydrophobes et l'encapsulation n'est pas complète, des globules d'huile subsistent. Dans le second cas, la réaction de transacylation a lieu au sein de gouttelettes aqueuses, dispersées dans une émulsion eau dans huile, ici encore, déclenchée par l'addition d'un acide.

La stabilisation par réticulation de polyphénols au sein des particules est intéressante car ils apportent une protection anti-radicalaire, efficace pour la protection de la vitamine C par exemple (200).

3.4.4.2. Méthode mixte

Cette méthode permet la fabrication de microsphères pleines entourées par une membrane covalente à base de PGA et d'une protéine. La partie microsphère est fabriquée par gélification d'alginate de sodium en présence d'un sel divalent. La solution aqueuse qui contient l'alginate de sodium contient aussi le PGA et la protéine. Cette phase est émulsionnée dans une phase hydrophobe qui contient un tensioactif. Une solution aqueuse de sel de calcium est ajoutée, ce qui va provoquer la gélification des gouttelettes de phase aqueuse. Ces microsphères sont ensuite dispersées dans une solution aqueuse alcaline qui va initier la réaction de transacylation entre le PGA et la protéine.

Cette technique donne des particules solides (gélifiées) recouvertes d'une membrane biocompatible, ce qui les rend particulièrement intéressantes pour des utilisations en libération contrôlée dans les domaines thérapeutiques.

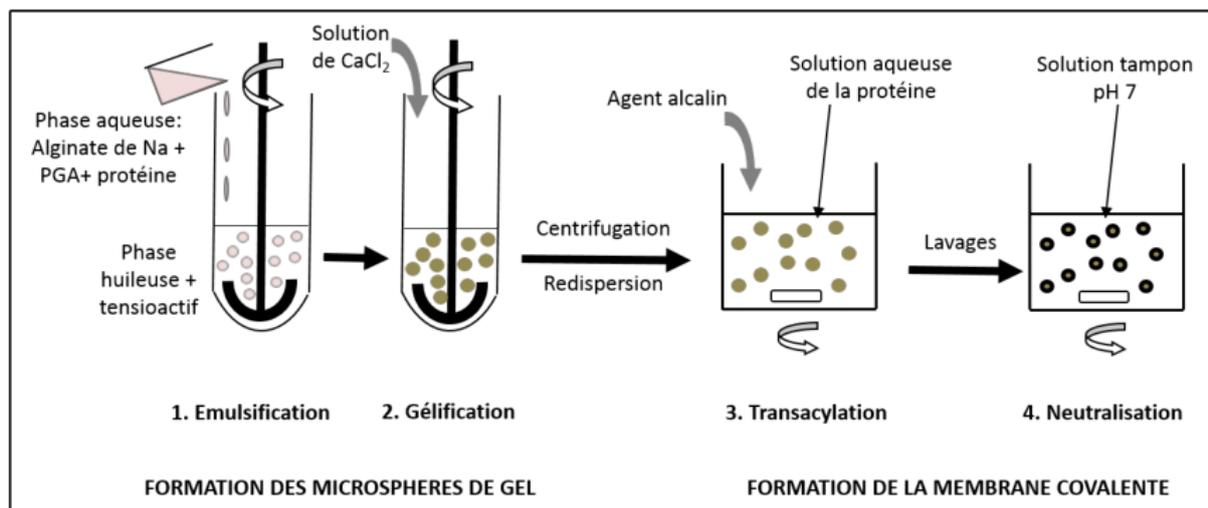


Figure 21 : Protocole mixte de formation de microsphère de gal à membrane.

3.4.4.3. Méthode en milieu aqueux

Pour ce procédé, une phase aqueuse qui contient de l'alginate de sodium ainsi que le PGA et une protéine est extrudée goutte à goutte dans une solution qui contient des sels de calcium. Au contact des sels de calcium les gouttes vont instantanément gélifier. Ces billes sont ensuite récupérées et re-suspendues dans une solution aqueuse alcaline de manière à déclencher la réaction de transacylation et former la membrane stable à la surface des billes. Une fois la membrane formée, les billes sont neutralisées et nettoyées pour éviter toute dégradation des polymères. Le cœur gélifié des particules ainsi formées peut à nouveau être liquéfié par trempage dans un bain qui contient un agent chélatant du calcium comme le citrate par exemple (216). De cette manière, il est possible d'estimer l'intégrité de la membrane. Cette

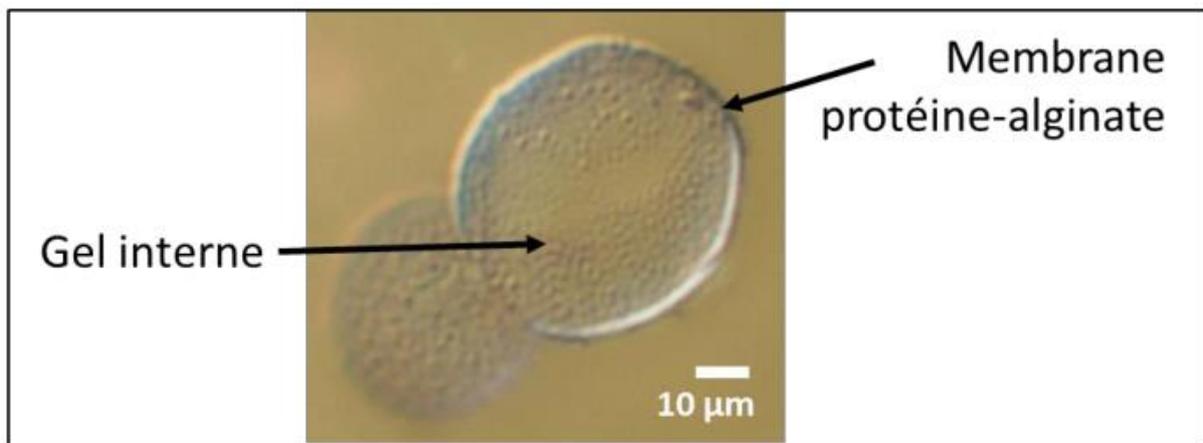


Figure 22 : Coupes de microsphères de gel à membrane Alginate-sérumalbumine humaine observées au microscope optique (cliché du laboratoire).

technique est particulièrement intéressante pour la bioencapsulation puisqu'il est possible d'immobiliser des cellules vivantes, des amas cellulaires ou encore des microorganismes au sein d'une membrane semi-perméable, ce qui le protège du milieu extérieur (217).

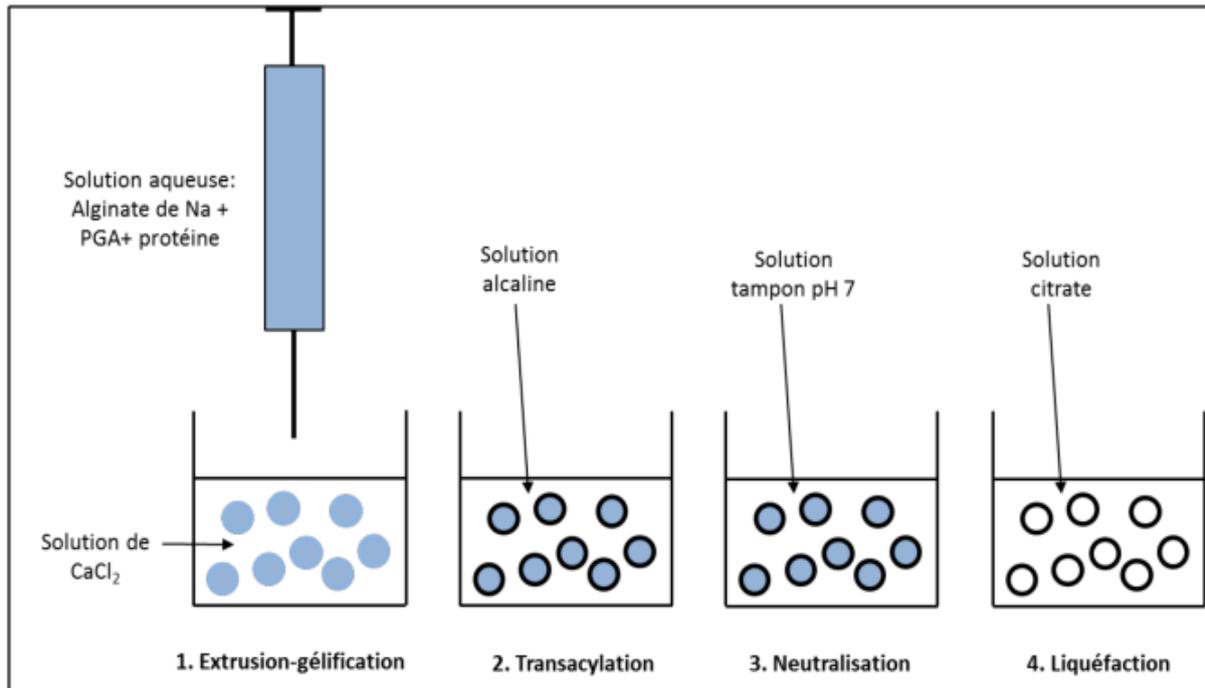


Figure 23 : Protocole de préparation des billes de gel à membrane PGA-protéine en milieu aqueux.

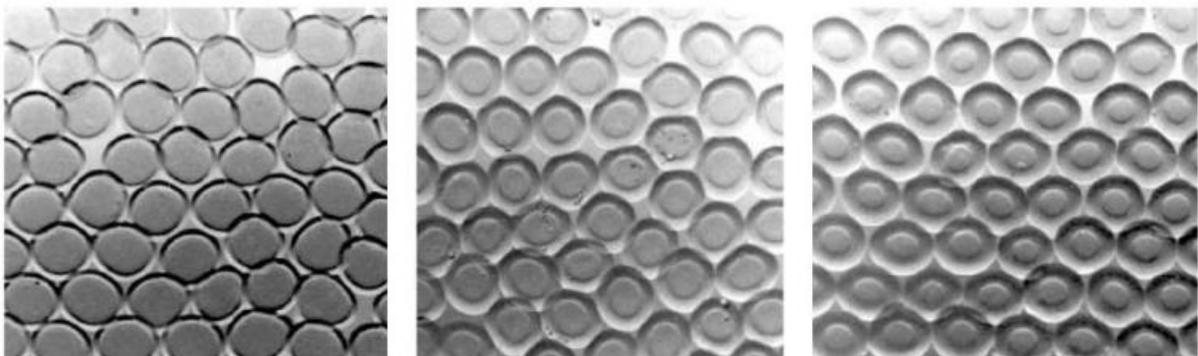


Figure 24 : Particules obtenues par transacylation par la méthode mixte.

4. Libération des substances encapsulées

Le but de l'encapsulation est bien de protéger une substance des conditions extérieures pouvant être agressives ou de masquer des propriétés indésirables. Mais la substance encapsulée ayant généralement un intérêt particulier (substance active, arôme, organisme vivant...), il faut s'assurer qu'elle puisse être libérée à un moment et, s'il le faut, au bon endroit. Il existe plusieurs facteurs qui peuvent influencer cette libération tels que des facteurs

thermodynamiques ou cinétiques, la structure chimique de la substance encapsulée mais aussi celle de la capsule, les propriétés physico-chimiques de la substance, la concentration initiale de la substance, le lieu de libération (présence de forces mécaniques, conditions physico-chimiques particulières...) (218,219). Il existe principalement 5 mécanismes de libération de la substance encapsulée qui sont la diffusion, la dissolution ou la fusion de la capsule, la destruction de la capsule, le gonflement ou bien la dégradation ou érosion de la capsule. Suivant la libération souhaitée (rapide, retardée, contrôlée...), il est possible de cibler un mécanisme en particulier plutôt qu'un autre ou bien d'en combiner plusieurs (220).

4.1. Libération par diffusion

Le mécanisme de libération par diffusion est le mécanisme le plus courant. Les molécules encapsulées deviennent mobiles grâce à un gradient de concentration qui apparaît entre l'intérieur et l'extérieur de la capsule. Dans ce genre de mécanisme, l'étape limitante est le taux de diffusion de la substance encapsulée. Le poids moléculaire de la substance encapsulée est donc un facteur important puisque plus la molécule sera grosse plus le taux de diffusion sera faible. La structure de la capsule doit aussi être prise en compte et en particulier le réseau qui la constitue. Si le réseau est très ramifié, la diffusion en sera ralentie tandis que si la membrane est très poreuse, la diffusion sera facilitée. La viscosité de la phase encapsulée et celle de la phase extérieure sont aussi à prendre en compte, de la même manière que la solubilité de la substance encapsulée dans les deux milieux, sa polarité ou son hydrophilie (221,222). La capacité d'une molécule à passer à travers la membrane ou à travers des canaux poreux est connue sous le nom de diffusivité. Cette diffusivité dépend principalement de la molécule considérée et du milieu dans lequel elle se trouve. Les molécules les plus grosses devraient avoir une diffusivité plus faible que les plus petites (220).

D'autres paramètres physico-chimiques peuvent également entrer en jeu comme le coefficient de partage. Dans les cas où plusieurs phases sont présentes dans le système (solide, aqueuse, huile), la répartition naturelle de la molécule active est dictée par le coefficient de partage. La valeur de ce coefficient traduit l'affinité thermodynamique de la molécule pour telle ou telle phase. Ce paramètre aura une influence directe sur la capacité de la molécule encapsulée à se déplacer dans les différentes phases et est donc à prendre en compte (223).

Parmi ces paramètres se trouve également le potentiel chimique. Ce potentiel traduit l'énergie thermodynamique d'une molécule en fonction du milieu dans lequel elle se trouve. La valeur de ce potentiel va être différente suivant que la molécule se trouve à l'intérieur de la capsule, à l'interface de la capsule et de la solution extérieure ou bien au sein de la solution extérieure. Les différences de potentiel chimique peuvent induire un gradient qui va alors être une des forces qui va diriger la diffusion de la molécule de manière à minimiser l'énergie thermodynamique au sein du système (224).

4.2. Libération par dissolution ou fusion

Ce mécanisme de libération implique la dissolution de la capsule dans un solvant approprié ou bien la fusion du matériau qui constitue la capsule sous l'effet de la température. Il est donc possible de contrôler la vitesse de libération en contrôlant l'épaisseur et la composition de la membrane. Plus celle-ci sera épaisse, plus la libération sera lente. Pour ce qui est de la dissolution, les matériaux les plus utilisés pour fabriquer les capsules sont des polymères hydrosolubles. En ce qui concerne la fusion, l'utilisation de lipides est favorisée. Ce genre de mécanisme de libération est largement utilisé dans le domaine de l'agroalimentaire (libérations d'arômes dans la bouche, lors d'un mélange avec de l'eau, pendant la cuisson...)

Cependant, la substance active peut ne pas être uniquement présente au cœur de la capsule mais aussi à la surface de celle-ci. Par conséquent, la diffusion de cette substance va aussi avoir un effet sur le mécanisme de dissolution en le retardant généralement (225).

4.3. Libération par gonflement

Il y a libération par gonflement lorsque la particule, formée d'un réseau de polymères entremêlés, est mise en présence d'un solvant, souvent l'eau. La particule verra son volume augmenter et donc sa structure changer. Cette étape de gonflement peut être suivie d'une dissolution de la membrane si le polymère qui la constitue est soluble dans le milieu extérieur. L'eau va se frayer un chemin de l'extérieur vers l'intérieur de la capsule ce qui va entraîner la formation d'un front de gonflement qui va petit à petit se déplacer vers le centre de la particule. A un moment, lorsque le milieu extérieur a pénétré suffisamment loin dans la particule, se déroule une étape où la mobilité des macromolécules augmente fortement (ce

phénomène est appelé relaxation de chaîne). La molécule contenue dans la particule est alors plus libre de ses mouvements et va pouvoir diffuser grâce au gradient de concentration (220).

Si le gonflement est relativement rapide, ce processus est alors limité par la vitesse de diffusion de la molécule encapsulée. Dans le cas contraire, c'est la vitesse de gonflement qui va limiter le système(225).

4.4. Libération par érosion ou dégradation

L'érosion ou la dégradation sont deux phénomènes qui vont conduire à la destruction de la particule de manière à libérer la substance encapsulée. Cette destruction va être entraînée par la destruction des liaisons polymériques conduisant à la formation d'oligomères ou de monomères. Les liaisons peuvent être détruites par une simple hydrolyse ou bien des conditions un peu plus dures comme des conditions acides ou basiques (dans l'estomac par exemple). Néanmoins, les mécanismes de ces deux phénomènes sont différents.

D'un côté, la dégradation va entraîner la destruction d'un seul coup de la particule dans son intégralité. La dégradation a lieu lorsque l'eau va pénétrer la structure de la particule plus rapidement que l'hydrolyse peut avoir lieu. De cette manière, l'eau va s'établir totalement dans la structure de la particule et les processus d'hydrolyse sont initiés partout en même temps. Ainsi toute la structure de la particule va être détruite. Même si l'hydrolyse est lente au départ, dès que le taux d'hydrolyse passe un certain point, le phénomène va s'accélérer. En effet, la structure qui se dégrade va laisser plus de place à l'eau pour s'engouffrer dans la structure et donc plus d'hydrolyse peut avoir lieu. La libération de la substance va donc se faire d'un seul coup.

De l'autre côté, l'érosion est un phénomène de surface qui a lieu lorsque l'hydrolyse est très rapide ou que l'invasion de l'eau dans la structure est très lente. Dans ce cas, la vitesse de libération de la substance est déterminée par la vitesse d'érosion.

Il est également possible que ce mécanisme soit déclenché par la présence d'enzymes ou certaines petites molécules (agents réducteurs) et non seulement par le solvant (225).

Ce mécanisme de libération est beaucoup utilisé dans le domaine médical car le système n'a pas besoin d'être enlevé du corps du patient. La contrainte en revanche est que les produits de dégradation ne soient pas toxiques (226).

4.5. Libération par une force extérieure

Il est aussi possible de déclencher la libération de la substance encapsulée par l'effet d'un facteur ou d'une force extérieure tel qu'un changement de pH, de force ionique, de température... Ceci peut être utilisé pour déclencher la libération de manière contrôlée et ciblée (par exemple dans l'estomac).

Il est également possible qu'une force mécanique soit à l'origine de la rupture de la capsule. Par exemple, des particules présentes dans une crème pour la peau peuvent se briser lors de l'application de celle-ci (227).

E. Plans d'expérience (228–231)

Les plans d'expérience sont des outils mathématiques d'optimisation de manipulation très utilisés en industrie. L'utilisation de ces outils permet d'identifier les facteurs influents dans le procédé mais également de mesurer leurs impacts. Cet outil, bien que relativement simple d'utilisation, cache une théorie mathématique qui peut être complexe mais surtout utilise une terminologie spécifique qu'il va falloir définir avant de poursuivre dans l'explication des plans d'expérience.

1. Définitions et vocabulaire

1.1. Vocabulaire

La théorie des plans d'expérience repose sur le fait que n'importe quel phénomène peut être mis sous la forme d'une équation de la forme :

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n) \quad (4)$$

avec :

y la grandeur à laquelle l'utilisateur s'intéresse, qui se nomme également la réponse, et x_i les variables que l'utilisateur va modifier. Ces variables peuvent être discrètes ou continues et sont appelées facteurs, f est la fonction mathématique qui explique le mieux le phénomène observé en se basant sur les variations des réponses en fonction des différentes valeurs prises par les facteurs. Cette fonction est le plus souvent un polynôme dont la forme exacte dépendra du nombre de facteurs et du problème étudiés.

L'utilisation des plans d'expérience se fait en faisant varier les facteurs, non pas avec une grande envergure mais plutôt entre deux niveaux limites. En fonction de l'étude, le manipulateur va définir deux niveaux pour les facteurs, un niveau haut et un niveau bas. Ces deux niveaux doivent être cohérents avec l'étude en cours. Par exemple, pour l'étude de l'optimisation de la recette d'un gâteau au chocolat, on fera varier le nombre d'œufs entre 1 (niveau bas) et 4 (niveau haut). Il ne serait pas cohérent de mettre un niveau haut à 32 œufs. Par convention, le niveau haut est noté « +1 » et le niveau bas est noté « -1 ».

1.2. Coordonnées centrées réduites

Lorsque l'on modifie un niveau de facteur pour lui attribuer la valeur +1 ou -1, deux modifications importantes sont opérées.

- On change l'unité de mesure. Si on prend l'exemple de la température de cuisson du gâteau on peut avoir un niveau bas à 160°C et un niveau haut à 200°C. Entre ces deux valeurs, il y a 40 unités de température alors qu'entre -1 et +1, il y a deux unités nouvelles. Une nouvelle unité vaut donc 20°C et est appelée le pas.
- On change l'origine des mesures. Dans l'exemple des températures ci-dessus, le milieu de l'intervalle [-1 ; +1] correspond à la température de 180°C. La nouvelle origine qui est à 0 est donc bien différente de l'origine exprimée en fonction des unités courantes de températures.

En faisant ces deux modifications, on obtient ce qui est noté « valeurs centrées réduites ». Centrées pour indiquer le changement de l'origine et réduites pour appuyer le fait qu'une nouvelle unité est utilisée. Pour passer de l'unité d'origine à l'unité centrée réduite, la formule suivante peut être utilisée :

$$x = \frac{A - A_0}{pas} \quad (5)$$

avec A la variable d'origine, A_0 la valeur centrale en unité d'origine.

Les variables centrées réduites sont utilisées car elles permettent de faciliter la représentation des plans d'expérience quels que soient les domaines d'étude et les facteurs étudiés. Ce sont ces variables centrées réduites qui permettent une généralisation de la théorie des plans d'expérience à tous les domaines d'étude.

1.3. Domaine expérimental et domaine d'étude

L'avantage des plans d'expérience est de pouvoir représenter l'équation du phénomène de manière géométrique. De manière à faciliter la représentation, un exemple à deux facteurs sera traité, ce qui donnera une représentation en deux ou trois dimensions. Si le nombre de facteurs augmente, cela ne pose pas de problème, mais nécessite l'utilisation de dimensions supérieures à 3 pour la représentation, ce qui n'est pas pratique. Cependant, la théorie reste la même quel que soit le nombre de facteurs et de dimensions.

Nous allons donc continuer avec l'exemple de la recette de gâteau. Dans notre cas, l'expérimentateur cherche à étudier l'influence de deux facteurs sur la hauteur du gâteau : la quantité de farine et la température de cuisson. Pour la représentation géométrique, on va attribuer à chaque facteur un axe de système cartésien. On appelle alors domaine expérimental le plan dans lequel toutes les températures et toutes les quantités de farine sont possibles. Le domaine d'étude sera alors une zone du domaine expérimental, délimité par les niveaux hauts et bas des deux facteurs. Par exemple, on aura la température limitée entre 160°C et 200°C et la farine limitée entre 200g et 300g.

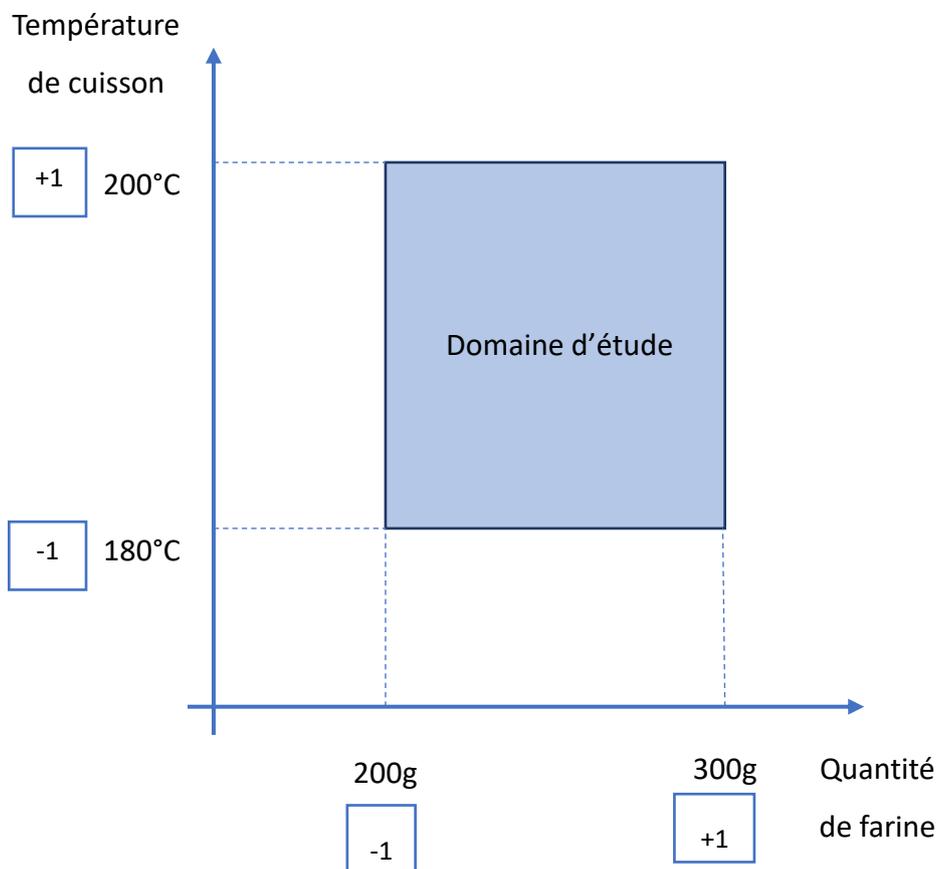


Figure 25 : Représentation géométrique d'un plan d'expériences à deux facteurs.

1.4. Facteurs continus et facteurs discrets

L'avantage des plans d'expérience est de fonctionner aussi bien avec des facteurs continus (température, pression, longueur...) qu'avec des facteurs discrets (identité d'un manipulateur, nature d'un tensioactif, solvant...). Dans le cas d'un facteur continu, on peut donner au facteur n'importe quelle valeur intermédiaire comprise entre les niveaux hauts et bas. On peut alors imaginer qu'un facteur continu puisse prendre plus que deux niveaux ce qui donnerait, en variable centrées réduites, -2, -1, 0, +1 et +2 par exemple. Dans le cas des facteurs discrets, on attribue arbitrairement les valeurs -1 et +1 aux deux niveaux (si ce facteur ne possède que deux niveaux).

Ces deux types de facteurs peuvent se trouver de manière simultanée dans une étude sans que cela ne pose le moindre problème. Cependant le traitement de ces deux types de facteurs peut être différent et il faut donc parfois adapter le plan d'expériences pour en tenir compte.

2. Mise en place d'un plan d'expériences.

La mise en place d'un plan d'expériences doit se faire de manière rigoureuse et minutieuse pour obtenir les résultats et les interprétations les plus représentatifs du système possibles. La première phase consiste à cerner le phénomène à étudier. Il est nécessaire de se poser les bonnes questions et de se demander si les réponses que l'on cherche n'existent pas déjà quelque part. Il faut pour cela faire appel à la littérature, aux experts, à la théorie... Cette première étape est la plus importante puisque se poser les bonnes questions va permettre de définir plus facilement le domaine d'étude, en particulier de choisir des niveaux cohérents pour les facteurs à étudier). La méthode se découpe ensuite en trois étapes principales.

2.1. Mise en place de l'expérimentation

Il s'agit ici de mettre en place une réflexion de manière à adapter le plan d'expériences en fonction des réponses que l'on veut observer et mesurer. A ce stade du plan d'expériences, il s'agit d'identifier les réponses qui seront enregistrées à chaque essai, de faire l'inventaire de tous les facteurs qui entrent en jeu dans le phénomène. Il s'agit ensuite de définir le ou les domaines d'étude pour chaque facteur étudié. C'est aussi le moment de se poser les questions concernant les contraintes que l'expérimentateur peut rencontrer : erreurs expérimentales,

contraintes matérielles ou expérimentales. Il est possible, grâce à cette méthode de réaliser des essais supplémentaires de manière à évaluer l'erreur expérimentale si nécessaire. Une fois cette première étape de réflexion effectuée (qui peut se faire seule ou en équipe), l'expérimentateur aura tous les éléments en main pour choisir le plan d'expériences le plus adapté.

2.2. Analyse des résultats

Une fois les essais réalisés, l'expérimentateur obtiendra une grosse quantité d'informations qu'il faudra alors traiter. Dans un premier temps il devra s'assurer de l'absence de résultats aberrants ou qui peuvent paraître faux. Il est aussi important à cette étape de s'assurer que les niveaux identifiés pour tous les facteurs ont été bien respectés. Enfin, l'expérimentateur devra aussi vérifier que le modèle mathématique associé au plan d'expériences est cohérent avec les résultats des essais.

Une fois toutes ces vérifications réalisées, l'expérimentateur pourra lancer les calculs et les interprétations des résultats. C'est à ce moment précis que le choix de faire quelques essais supplémentaires pour compléter les résultats devra être fait. Il est également possible de changer le plan d'expériences pour passer par exemple à un plan d'optimisation plutôt que de criblage.

2.3. Bilan

A l'issue du plan d'expériences et de toutes les interprétations, il est temps de faire un bilan sur les conclusions tirées. Il est possible que la réalisation de ce plan d'expériences, en plus d'apporter des réponses aux questions initiales, apporte des questions supplémentaires. Une fois le bilan réalisé, l'expérimentateur aura, quoi qu'il arrive, des indications pour la suite de ses recherches. Si le plan a permis de répondre à toutes les questions il n'y a pas forcément lieu de continuer dans les expérimentations. Mais ce cas de figure n'est pas le plus courant. Il est habituel que la mise en place d'un plan d'expériences apporte des réponses à certaines questions mais laisse des zones d'ombre. Il faut alors faire des essais complémentaires. Mais avant de lancer les expérimentations, quelques réflexions doivent avoir lieu.

Il faut d'abord vérifier que le domaine d'étude contient bien les réponses que l'expérimentateur cherche, sinon il faudra en redéfinir les bornes pour que les réponses s'y

trouvent. Ensuite, après avoir vérifié l'adéquation du modèle mathématique, l'expérimentateur pourra choisir de le conserver ou de le modifier.

Grâce aux plans d'expériences, rien n'est perdu. En effet, même si les premiers essais ne permettent pas de répondre aux questions, ils permettent quoi qu'il arrive d'orienter les choix pour les essais à suivre.

3. Les plans factoriels complets à deux niveaux

Il existe plusieurs types de plans d'expérience qui ont chacun des niveaux de complexité différents. Certains plans sont plus adaptés à certaines situations que d'autres. Les plans les plus répandus sont les plans factoriels complets à deux niveaux parce que ce sont les plus simples et qu'ils servent de base à tous les autres types de plans.

Ces plans sont les plus simples car chaque facteur étudié ne peut prendre que deux niveaux de valeur (niveau haut et bas comme vu précédemment). Cette particularité se retrouve dans l'écriture spécifique utilisée pour ce type de plan : 2^k

- Le 2 indique que chaque facteur peut prendre deux niveaux
- Le k en exposant indique le nombre de facteurs que comporte le plan.

3.1. Cas d'un plan à deux facteurs

De manière à simplifier les explications dans la suite de ce chapitre, l'exemple se basera sur un plan de type 2^2 , mais ses caractéristiques peuvent facilement se généraliser à k facteurs.

Le nombre d'expériences à réaliser pour construire un plan complet est le résultat de 2^k : Si le plan comporte deux facteurs, il faudra réaliser 2^2 expériences soit 4 expériences. Il faudra donc 2^3 soit 8 expériences pour trois facteurs, 16 expériences pour 4 facteurs et ainsi de suite. Il est donc aisé de se rendre compte de la limitation de ce genre de plan. Si l'expérimentateur veut étudier beaucoup de facteurs, le choix d'un autre type de plan sera conseillé.

Il a été vu dans la partie précédente qu'il était possible, pour un nombre de facteurs inférieur ou égal à trois, de représenter le domaine d'étude. Il a été vu également que chaque point de ce domaine pouvait donner une combinaison de valeur pour les facteurs et donc conduire à une expérience. Passer sur tous les points possibles dans ce domaine serait très long et fastidieux, voire impossible. Il faut donc que l'expérimentateur puisse choisir les points les

plus intéressants pour faire ses essais. Etant donné que l'utilisateur n'a pas vraiment d'informations sur la fonction f , il devra faire des suppositions et appliquer une loi d'évolution de la réponse en fonction des variables. Dans un premier temps, seuls deux essais seront faits par facteur, l'utilisateur peut adopter une loi du premier degré. Dans le cas d'un plan complet à deux niveaux qui ne comporte que 2 facteurs, la loi est la suivante :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 \quad (6)$$

On peut alors démontrer que la meilleure façon de placer les points expérimentaux est de les placer aux sommets du domaine d'étude (sommets d'un carré si deux facteurs, sommets d'un cube si trois facteurs, au-delà de 3 facteurs, une représentation matricielle sera nécessaire). Dans le cas d'un plan 2^2 , on peut représenter facilement le domaine d'étude à l'aide d'un carré, dont les sommets seront A, B, C et D. Il est possible d'utiliser une représentation matricielle également pour 2 ou trois facteurs et l'on peut passer d'une représentation à l'autre dans ce cas.

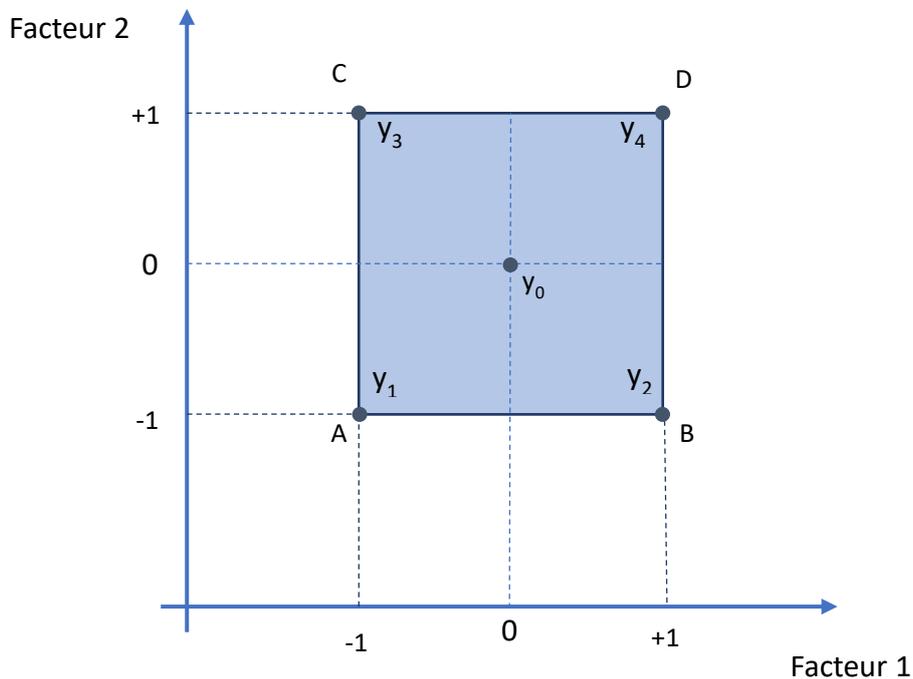


Figure 26 : Placement des points expérimentaux et notations.

Tableau 2 : Matrice des essais à réaliser.

Numéro de l'essai	Facteur 1	Facteur 2
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
Domaine d'étude		
Niveau bas	200g	180°C
Niveau haut	300g	200°C

Comme il est possible de le voir dans le Tableau 2, il y a deux sous-tableaux qui contiennent respectivement les essais à réaliser et les limites du domaine d'étude. Dans le premier sous-tableau, on trouve trois colonnes. La première donne le numéro des essais à réaliser, la deuxième et la troisième donnent, en valeurs centrées réduites, les coordonnées des points expérimentaux. Par exemple, l'essai numéro 1 sera celui pour lequel les facteurs 1 et 2 seront au niveau bas (respectivement 200g de farine et 180°C), et cet essai correspond au point A de la Figure 26.

Tout l'intérêt des plans d'expérience est de déterminer l'influence d'un facteur sur le phénomène étudié et pour cela l'expérimentateur va mesurer son effet. Une fois tous les essais réalisés et toutes les réponses enregistrées, l'expérimentateur peut, grâce à l'équation (16), déterminer l'effet de chaque facteur. Toujours pour un plan complet 2^2 , l'expérimentateur a réalisé 4 essais et mesuré 4 réponses, il a donc un système de 4 équations à 4 inconnues qu'il est possible de résoudre. Pour chaque réponse, l'expérimentateur peut remplacer les x_i par leurs valeurs on obtient :

$$y_1 = a_0 - a_1 - a_2 + a_{12} \quad (7)$$

$$y_2 = a_0 + a_1 - a_2 - a_{12} \quad (8)$$

$$y_3 = a_0 - a_1 + a_2 - a_{12} \quad (9)$$

$$y_4 = a_0 + a_1 + a_2 + a_{12} \quad (10)$$

Avec les 4 réponses enregistrées, les seules inconnues du système sont a_0, a_1, a_2, a_{12} qui sont les coefficients du modèle.

Une fois le système résolu, on obtient :

$$a_0 = \frac{1}{4}(+y_1 + y_2 + y_3 + y_4) \quad (11)$$

$$a_1 = \frac{1}{4}(-y_1 + y_2 - y_3 + y_4) \quad (12)$$

$$a_2 = \frac{1}{4}(-y_1 - y_2 + y_3 + y_4) \quad (13)$$

$$a_{12} = \frac{1}{4}(+y_1 - y_2 - y_3 + y_4) \quad (14)$$

a_0 est généralement acceptée comme étant la moyenne des quatre réponses (si on donne à x_1 et x_2 la valeur 0, on se trouve au centre du domaine d'étude et l'équation

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 \quad (6)$$

devient $y_0 = a_0$.

a_{12} est l'effet de l'interaction entre le facteur 1 et le facteur 2. Il y a interaction entre deux facteurs lorsque l'effet d'un facteur dépend du niveau de l'autre facteur.

On peut donc compléter la matrice présentée dans le Tableau 2 pour y faire apparaître toutes ces informations. Ce tableau aura au départ des cases vides qui se complèteront au fur et à mesure que l'expérimentateur aura réalisé les essais et enregistré les réponses. Il existe plusieurs règles à respecter lors du remplissage de tableau qui peut aussi porter le nom de « matrice de calcul des effets ».

Pour remplir les colonnes de signes, il faut, quel que soit le nombre de facteurs, respecter les règles suivantes :

- La colonne de la moyenne est constituée de coefficients positifs uniquement.
- La colonne du facteur 1 comprend une alternance régulière de signes négatifs (toujours un signe négatif en premier) et de signes positifs.
- La colonne deux contient une alternance deux par deux de signes négatifs (ici aussi, signes négatifs en premiers) et de signes positifs.

- Pour les colonnes de facteurs supplémentaires, il y a toujours une alternance mais le nombre de facteurs dans un bloc passe à la puissance de 2 suivantes (4 par 4, puis 8 par 8...) en commençant toujours par les signes négatifs.
- Pour chaque facteur, il y a autant de signes positifs que négatifs.
- Les signes des colonnes « interaction » s'obtiennent en faisant le produit des colonnes « facteurs » impliquées dans l'interaction.

Tableau 3 : Représentation complète d'un plan d'expériences.

Numéro de l'essai	Moyenne	Facteur 1	Facteur 2	Interaction 12	Réponse Hauteur du gâteau (cm)
1	+1	-1	-1	+1	3
2	+1	+1	-1	-1	10
3	+1	-1	+1	-1	5
4	+1	+1	+1	+1	15
Effets et interactions	8,25	4,25	1,75	0,75	
Domaine d'étude					
Niveau bas		200g	180°C		
Niveau haut		300g	200°C		

Les résultats indiqués mis dans ce tableau sont complètement arbitraires et ne représentent pas forcément la réalité mais permettent d'illustrer les explications.

Grâce aux résultats des expériences, l'équation

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 \quad (6)$$

peut être réécrite sous la forme :

$$y = 8,25 + 4,25x_1 + 1,75x_2 + 0,75x_1x_2 \quad (15)$$

On peut alors remarquer que les deux facteurs présentés dans cet exemple ont un effet non négligeable sur le résultat de l'expérience. Le facteur 1 a néanmoins un effet plus important que le facteur 2. Il peut donc être conclu, grâce à ce plan d'expériences, que les meilleures conditions pour la réalisation de ce gâteau sont lorsque les deux facteurs sont au niveau haut

(300g de farine et une cuisson à 200°C). Ces résultats impliquent bien sûr que tous les autres paramètres de l'étude qui ne sont pas compris dans le plan d'expériences restent constant (pour cet exemple, quantité d'œufs, type de farine, forme du moule ...). Dans le cas contraire, les résultats du plan d'expériences ne seraient pas fiables. Il est néanmoins possible d'intégrer ces paramètres dans un plan d'expériences en augmentant le nombre de facteurs étudiés (et donc le nombre d'essais).

3.2. Généralisation pour k facteurs

La théorie expliquée dans les paragraphes précédents reste la même dans le cas de k facteur, seules quelques notations vont être amenées à changer de manière à en simplifier l'écriture. Le modèle mathématique reste un polynôme qui va prendre en compte la moyenne, les effets de tous les facteurs mais également les interactions entre les facteur pris deux à deux, trois à trois, ..., k à k.

L'équation

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 \quad (6)$$

devient :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \sum a_{ijl} x_i x_j x_l + \dots + a_{ijl\dots k} x_i x_j \dots x_k \quad (16)$$

Comme dit précédemment, un plan 2^k comporte 2^k points expérimentaux et se situent aux sommets d'un objet à k dimensions. On obtient également un système à 2^k équations et 2^k inconnues.

Bien que très puissants, ces plans fractionnaires complets sont compliqués à mettre en place dès lors que le nombre de facteurs est supérieur à 3 ou 4 en raison du grand nombre d'expériences qu'il faudrait alors réaliser. Un autre type de plan a alors été développé de manière à diminuer le nombre d'essais nécessaires sans diminuer le nombre de facteurs étudiés. Ces nouveaux plans sont les plans factoriels fractionnaires de notation 2^{k-p} . Comme ceux-ci n'ont pas été utilisés, ils ne seront pas décrits.

4. Optimisation et plan de Scheffé (232)

Les plans complets et fractionnaires présentés juste avant permettent généralement de mieux connaître et comprendre le système avec lequel on travaille, au moins à travers une première approche. Une fois ce type de plans réalisés, l'expérimentateur a une meilleure connaissance du système et connaît généralement les facteurs les plus influents par rapport aux réponses qui l'intéressent. Cependant, il est possible d'aller plus loin et d'utiliser les plans d'expériences à des vues d'optimisation du système. Une fois les paramètres les plus influents et les plus pertinents identifiés, il est possible de se focaliser sur la variation de ceux-ci. Des exemples classiques sont trouvés dans les domaines de la cosmétique, et de la formulation en général, où l'on utilise beaucoup de plans de mélanges. Un des plans les plus simple à utiliser et qui est applicable à grand nombre de situations est le plan (ou modèle) de Scheffé.

4.1. Modèle mathématique de Scheffé

L'avantage du modèle de Scheffé est qu'il peut s'adapter à différentes situations et à différentes complexités de phénomènes en permettant à l'utilisateur de varier le degré du polynôme utilisé. Les polynômes les plus courants se limitent aux modèles quadratiques ou cubiques. L'expression du modèle est la suivante :

$$\begin{aligned}
 y = & \beta_1 x_1 + \dots + \beta_q x_q \\
 & + \beta_{12} x_1 \times x_2 + \dots + \beta_{q-1, q} x_{q-1} \times x_q \\
 & + \beta_{123} x_1 \times x_2 \times x_3 + \dots + \beta_{q-2, q-1, q} x_{q-2} \times x_{q-1} \times x_q \\
 & + \gamma_{12} x_1 \times x_2 \times (x_1 - x_2) + \dots + \gamma_{q-1, q} x_{q-1} \times x_q \times (x_{q-1} - x_q) \\
 & + \varepsilon
 \end{aligned}$$

La première ligne correspond au modèle du premier degré à q coefficients, la deuxième ligne au modèle quadratique, la troisième ligne au modèle cubique réduit et la quatrième ligne au modèle cubique complet.

En termes de notation, Y et X_i sont utilisés pour désigner la réponse ou le ième facteur respectivement. La notation en minuscule y et x_i sont les valeurs prises par la réponse Y ou le facteur X_i .

Il est intéressant de noter que dans ce modèle :

- le terme β_0 n'est pas présent car il n'aurait aucun sens pratique. Il correspondrait au point où tous les composants auraient une composition nulle.
- Ce modèle est symétrique par rapport à tous les composants du mélange étudié.
- Les coefficients β_i correspondent à la valeur que prendrait la réponse si le composant X_i était seul dans le mélange.

Il convient en général de trouver une forme géométrique adaptée pour la représentation du domaine expérimental. En effet, la présence quasi systématique de 3 ou plus composants ne permet pas l'utilisation d'un tableau à deux axes. On utilisera alors le triangle pour les plans avec trois composants et les pyramides pour les plans à 4 composants.

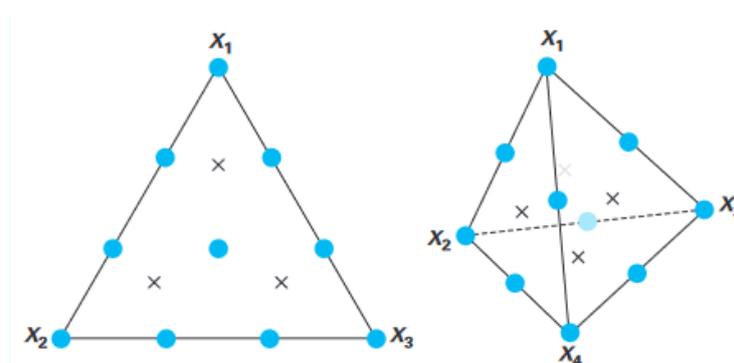


Figure 27 : Exemples de représentations de Scheffé. A gauche : 3 composants et modèle cubique complet. A droite : 4 composants et modèle quadratique. Les points bleus représentent les points expérimentaux et les croix les points tests.

Les illustrations ci-dessus fonctionnent dans le cas où aucun des composants n'a de contrainte. Il est possible, dans de nombreux cas, qu'un ou plusieurs des constituants soit soumis à des contraintes. Par exemple, dans une formulation d'émulsion, la présence d'un tensioactif est nécessaire pour obtenir une stabilité satisfaisante. Par conséquent, le composant « tensioactif » devra avoir une valeur différente de 0. Le domaine expérimental sera alors tronqué d'une partie.

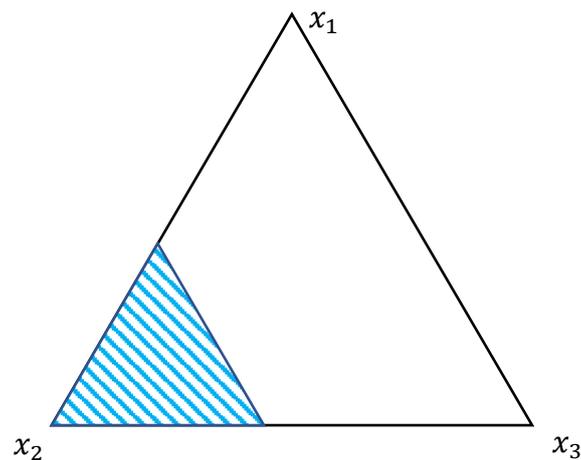


Figure 28 : Exemple d'un domaine expérimental à trois composants tronqué.

Les points expérimentaux seront alors placés différemment pour prendre en compte cette troncature. Ils sont généralement placés aux sommets du polygone créé par la troncature.

L'intérêt des modèles de Scheffé est également de pouvoir générer des courbes de niveau et des surfaces de réponse pour le système étudié. Cela permet une représentation visuelle de la façon dont réagit le système face à des modifications de sa composition.

4.2. Optimisation

Un autre intérêt des plans de Scheffé est la possibilité d'optimiser le système grâce aux réponses obtenues. Pour chaque réponse relevée par l'expérimentateur, celui-ci peut définir des seuils d'acceptabilité ou de désirabilité. Cette étape d'optimisation se réalise uniquement de manière numérique et ne nécessite aucune manipulation supplémentaire. Le but de l'optimisation est de rechercher d'un point de vue mathématique, les valeurs des facteurs qui donnent les réponses prévisionnelles qui répondent le mieux aux exigences du manipulateur.

4.2.1. Choix du profil de désirabilité

De manière concrète, le manipulateur va devoir, pour chaque réponse étudiée, dresser un profil de désirabilité qui traduit son degré de satisfaction en fonction de la valeur de la réponse. Cette désirabilité est le plus souvent exprimée en pourcentage avec 100% pour la

valeur la plus satisfaisante et 0% pour une valeur non acceptable. Toutes les valeurs entre ces deux bornes sont plus ou moins acceptables en fonction du problème posé. Il existe alors différents profils de désirabilité pour que l'utilisateur puisse affiner au maximum la démarche mathématique pour chaque réponse. Les différents profils sont :

- Profil unilatéral gauche : Dans ce cas, la valeur de la réponse y ne doit pas descendre en-dessous d'un certain seuil, auquel cas, la valeur de la désirabilité diminue. Tant que cette valeur ne descend pas en dessous du seuil choisi, le manipulateur est satisfait à 100%.
- Profil unilatéral droit : Ce profil se base sur le même principe que le profil précédent mais pour des valeurs croissantes. La valeur de la réponse ne doit pas aller plus haut que la valeur seuil choisie par le manipulateur.
- Profil bilatéral : Ce profil est utilisé lorsque la réponse doit être la plus proche possible d'une valeur cible. Un intervalle $[y_{min}; y_{max}]$ est souvent défini et la valeur de la réponse ne doit pas en sortir (auquel cas, la désirabilité passe à 0%). Ce profil n'est pas obligatoirement symétrique.
- Profil bilatéral avec tolérance : Même cas que le profil précédent mais la valeur cible est en fait un plateau.

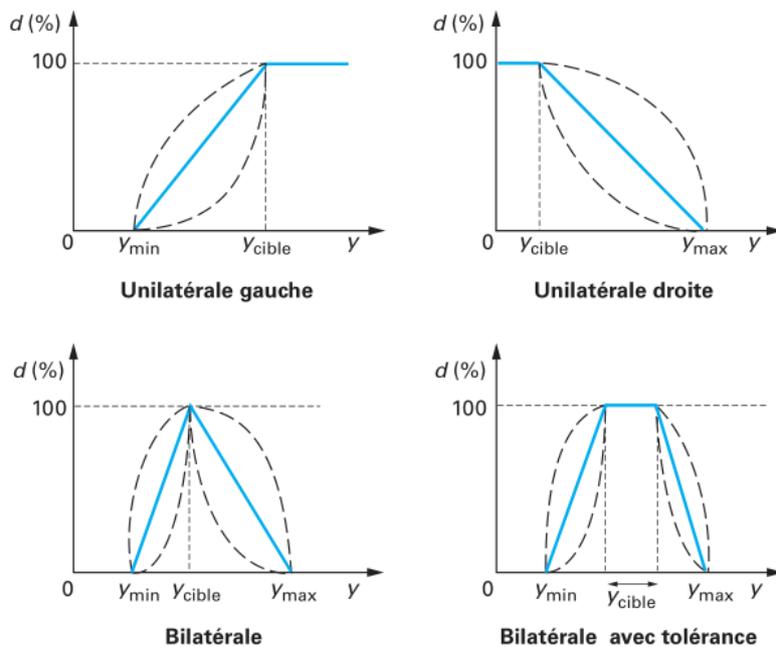


Figure 29 : Illustrations des différents profils de désirabilité.

Les profils décrits ci-dessus peuvent être associés à des fonctions linéaires (tracé bleu sur la Figure 29) ou bien non linéaires (tracé en pointillés noirs). Dans le cas des fonctions non linéaires, l'arrondi peut être plus ou moins prononcé et surtout, concave ou convexe. Dans le cas d'une courbe convexe, la valeur cible est plutôt présente à titre indicatif et apporte une plus importante tolérance. Si la valeur s'éloigne un peu de la valeur cible, l'indice de désirabilité ne changera pas de manière importante. Dans le cas des courbes concaves, une très grande importance est observée à l'égard de la valeur cible. Le manipulateur n'est prêt à s'éloigner de la valeur cible que si cela permet d'améliorer grandement les désirabilités des autres réponses.

4.2.2. Calcul de la désirabilité

Une fois toutes les valeurs seuils choisies et les profils de désirabilité mis en place, il convient de calculer la désirabilité globale à partir des désirabilités partielles. Les désirabilités partielles sont celles qui ne concernent qu'une seule réponse en particulier. La fonction de désirabilité globale est alors calculée avec la formule suivante :

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m} \quad (24)$$

Avec D la désirabilité globale, m le nombre de réponses et d_i les désirabilités partielles pour chaque réponse. On remarque alors que la désirabilité globale est nulle si une des désirabilités partielles est égale à 0.

Optimiser le système d'étude revient alors à maximiser la valeur de la désirabilité globale. Il est rare que toutes les conditions soient réunies pour que chaque désirabilité partielle soit égale à 100 et donc que la désirabilité globale soit également égale à 100%. Il convient souvent de faire un compromis sur une ou plusieurs réponses (en adaptant leur désirabilité) pour maximiser D .

De manière à avoir une représentation graphique supplémentaire, l'utilisateur peut choisir de représenter la désirabilité globale sur le domaine d'étude par courbe de niveau ou bien par surface en trois dimensions. Ces représentations ont l'avantage de montrer directement le point ou la zone pour lesquels la désirabilité est à son maximum.

Chapitre 2 : Influence de l'ajout de sels sur la fabrication de microparticules

Introduction

Le protocole de fabrication de microparticules présenté dans cette étude a été développé par le laboratoire à partir de polymères d'origine naturelle et ne fait pas appel à des agents de réticulation toxiques. Ces distinctions en font un protocole particulièrement adapté pour des utilisations dans les domaines pharmaceutiques et cosmétiques (216). L'avantage d'utiliser des polymères d'origine naturelle est de pouvoir en sélectionner qui permettent de produire des particules biocompatibles et biodégradables, ce qui est en adéquation avec les tendances environnementales actuelles et avec le cahier des charges des industries pharmaceutiques et cosmétiques. Cependant, le problème des produits d'origine naturelle est qu'il est difficile de contrôler leur nature et leur structure chimique. En effet, selon la source et la voie d'extraction, des différences importantes peuvent être observées (233).

Les deux polymères d'origine naturelle de cette étude sont l'alginate de propylène glycol (PGA), issu d'algues brunes et la sérumalbumine humaine (HSA), issue du plasma sanguin. Ces deux polymères sont dissous dans la même phase aqueuse avant l'émulsification. La problématique de ces deux polymères est de présenter chacun une charge globale négative. Cette similitude de charge va entraîner une répulsion électrostatique au sein de la phase aqueuse, ce qui conduit à une turbidité importante. Comme présenté dans l'état de l'art, cette séparation de phase a sûrement pour origine d'un côté une répulsion électrostatique (115) et de l'autre une incompatibilité thermodynamique, les deux polymères étant très hydrophiles et plutôt encombrants (119). La séparation de phase observée est donc une séparation de phase liquide-liquide (observée au microscope optique).

Comme toute séparation de phase, celle-ci dépend de la quantité de polymères présents simultanément dans la phase aqueuse. Dans le cas des faibles concentrations, une co-solubilité peut être atteinte et une faible turbidité est alors observée. Puis, lorsque les concentrations en polymères augmentent, la turbidité devient de plus en plus importante (118).

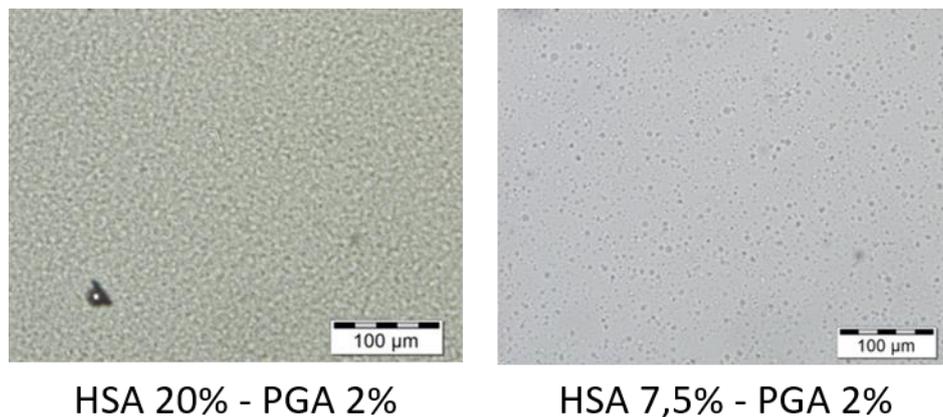


Figure 30 : Séparation de phase liquide-liquide observée pour les phases aqueuses pour différentes concentrations en polymères.

Pour la préparation de microparticules via le protocole usuel, une concentration en polymères minimum est requise, sinon aucune particule ne peut être obtenue. L'hypothèse de départ pour expliquer ce phénomène est que la présence de répulsions entre les deux polymères, à faibles concentrations, ne permet pas la rencontre efficace entre les polymères pour l'établissement du réseau et donc l'obtention de particules. Pour pallier ce problème, l'ajout de sel dans le milieu pourrait écranter ces répulsions et potentiellement étendre la zone de faisabilité des particules. Si l'hypothèse s'avère correcte, cela serait intéressant car il deviendrait possible de fabriquer des particules avec de faibles quantités de matière première.

Dans un premier temps ce chapitre se concentrera sur les conditions de l'observation d'une séparation de phase au sein de la phase aqueuse. Ensuite, un sel sera ajouté dans le milieu et la phase aqueuse sera étudiée pour identifier l'effet du sel sur les propriétés physicochimiques de cette phase. Des microparticules en présence de sel seront alors fabriquées et étudiées. Enfin, plusieurs sels de natures chimiques différentes seront ajoutés à la phase aqueuse pour étudier plus en profondeur l'effet du sel et de sa nature chimique sur la phase aqueuse et les particules obtenues.

A. Matériels et méthodes

1. Matières premières

Le PGA utilisé est aimablement offert par FMC BioPolymer (Profoam©, Degré d'Estérification (DE) 84 %, même lot utilisé pendant tous les essais). Il est destiné à des applications en agroalimentaire.

L'HSA sous forme de solution injectable de 200 mg/ml est procurée par LFB biomédicaments (Vialebex©) et est lyophilisée de manière stérile avant son utilisation.

L'eau utilisée pour la préparation des solutions aqueuses des polymères provient des laboratoires Aguetant.

Les sels utilisés sont NaCl (VWR), KCl (Prolabo – Rhône Poulenc), LiCl (Sigma Aldrich) et KI (Fagron).

Le myristate d'isopropyle est fourni par la Stéarinerie DUBOIS FILS, Grenoble. Le Span 85 ainsi que les autres tensioactifs de la famille des Spans et des Tweens proviennent de Sigma Aldrich.

2. Préparation des solutions

Toutes les solutions pour les mesures de turbidité sont réalisées de la même manière. Les pourcentages indiqués correspondent à un pourcentage massique par rapport au total de l'échantillon (un échantillon de 10 g à 3% en HSA et 1,5% en PGA contiendra 0,3g d'HSA, 0,15g de PGA et 9,55g d'eau ou de solution saline).

Dans le cas de l'HSA seule en solution, celle-ci est dissoute juste avant utilisation dans le volume d'eau ou de solution saline appropriée.

Dans le cas du PGA seul, celui-ci est ajouté en fine pluie dans l'eau ou la solution saline sous agitation. L'agitation est maintenue pendant une nuit avant que la solution ne soit utilisée.

Dans le cas du mélange des deux polymères, la totalité du PGA est ajoutée à l'eau ou la solution saline en pluie fine et le tout est laissé sous agitation pendant une nuit. Le lendemain, l'HSA lyophilisée est ajoutée et l'agitation est maintenue jusqu'à dissolution complète. La

phase aqueuse ainsi obtenue est alors utilisée immédiatement ou bien conservée au réfrigérateur jusqu'à utilisation (au maximum dans la semaine de la préparation).

3. Mesures de turbidité

La turbidité des solutions aqueuses est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Beckman-Coulter DU720) à une longueur d'onde de 500nm dans une cuvette en quartz de 2 ml. Suivant la viscosité des solutions, une centrifugation rapide peut être nécessaire (3 minutes à 3000rpm) pour se débarrasser des petites bulles d'air. Sont mesurées à chaque fois la transmittance de l'échantillon ainsi que son absorbance. Toutes les mesures sont réalisées 2 fois.

La turbidité de l'échantillon est ensuite déterminée par la formule suivante :

$$T = -\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (25)$$

Avec I la transmittance de l'échantillon et I_0 la transmittance de l'eau, soit 100%.

4. Mesures de viscosités

Les solutions utilisées pour les mesures de viscosités sont réalisées de la même manière que pour la turbidité. Le volume nécessaire pour la mesure est de 20mL.

Les mesures de viscosités sont réalisées à l'aide d'un rhéomètre Rhéomat© RM300. La géométrie utilisée (MK-HS125/36) est constituée d'un cylindre creux dans lequel s'insère un rotor. La solution à mesurer est insérée entre le rotor et le stator. On applique au rotor une vitesse de rotation connue et on mesure la tension subie par le rotor. On peut déduire la viscosité de la solution.

La vitesse de rotation du rotor est modifiée de $1000s^{-1}$ à $10000s^{-1}$ en 200 secondes. Un plateau de 5 secondes est maintenu, puis la descente de vitesse se fait de la manière inverse à la montée.

5. Fabrication des particules

Les phases aqueuses sont fabriquées de la même manière que pour les mesures de turbidité (10g sont préparés pour un lot de particules). Les concentrations en polymères seront amenées à varier et seront systématiquement précisées lorsque cela sera nécessaire.

Le protocole dit « standard » est le suivant : 6 ml de phase aqueuse sont émulsionnés dans 40 ml de myristate d'isopropyle contenant 5% m/m de Span 85, à 1500rpm pendant 5 minutes. L'émulsification se fait dans un tube en verre à l'aide d'une pale en forme d'ancre. Après 5 minutes d'agitation, 4 ml de solution de NaOH à 2% dans l'éthanol à 95% sont ajoutés pour augmenter le pH du milieu et ainsi initier la réaction de transacylation. Le temps de réaction est de 15 minutes. Au bout de 15 minutes de réaction, 150 ml de tampon imidazole pH 7 sont ajoutés pour stopper la réaction et l'agitation est maintenue pendant 2 minutes. La pale est ensuite retirée et le tube est laissé au repos pendant 15 minutes de manière à faire sédimenter les particules formées. Le surnageant est retiré puis les particules sont lavées : une fois avec de l'eau stérile contenant 2% m/m de tween 80 puis deux fois avec de l'eau stérile pure. Les particules sont ensuite conservées dans l'eau stérile.

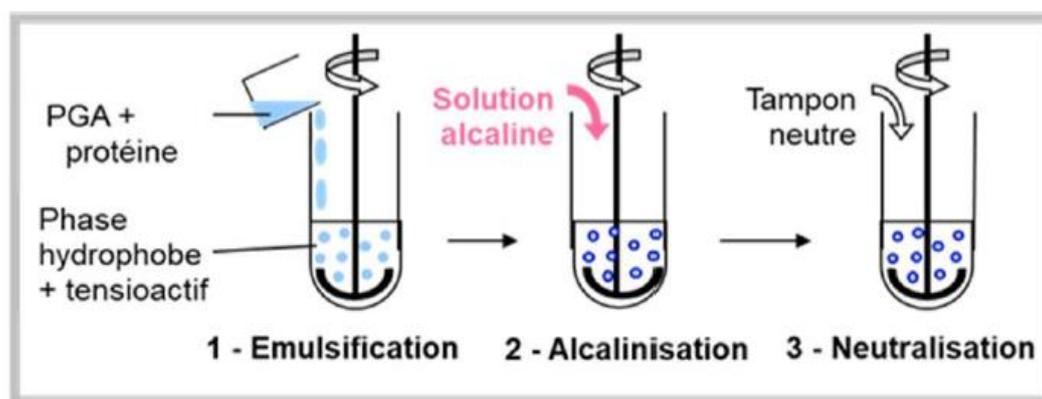


Figure 31 : Schéma représentant le procédé de fabrication des microparticules par transacylation en émulsion.

Les paramètres qui ont varié dans l'étude sont : la concentration en HSA (0,5% à 20%), la concentration en PGA (0,6% à 5%), la concentration en sel (0mM à 3600mM), la nature du sel (NaCl, KCl, LiCl, KI), la nature des polymères (pectine de betterave, pectine de betterave déacétylée, ester d'alginate de propylène glycol), la nature et les quantités des tensioactifs (Span 85, Span 80, Span 20, de 0% à 10%), la nature de la phase aqueuse (myristate

d'isopropyle et huile de paraffine), la vitesse et le temps d'agitation (de 1200 à 5000 rpm et de 15 à 45 minutes respectivement).

6. Mesures de tailles des particules

La distribution de tailles des lots de particules est mesurée à l'aide d'un granulomètre laser (Malvern Mastersizer©). La cellule de mesure est remplie avec de l'eau déminéralisée et un blanc est réalisé. L'échantillon est ensuite ajouté jusqu'à atteindre l'intensité de détection désirée. Le logiciel joint à l'appareillage donne alors les D10 (10 % de la population particules en dessous de cette valeur), D50 (ou diamètre moyen, 50% de la population de particules se trouve en dessous de cette valeur) et D90 (90% de la population de particules se trouve en dessous de cette valeur). La valeur de « span » ou indice de polydispersité PI (qui sera utilisé par la suite pour éviter les confusions avec les tensioactifs de la famille des Span) peut alors être calculée :

$$PI = \frac{D90 - D10}{D50} \quad (26)$$

Cet indice donne une idée de la dispersion de tailles de l'échantillon de particules. Plus celui-ci est élevé, plus la dispersion de tailles est grande.

7. Observation des particules et morphologies

Les particules sont observées grâce à un microscope optique (Olympus BX51 équipé avec une caméra Olympus DP26 CCD et le logiciel StreamMotion). Les particules sont colorées au bleu de méthylène pour faciliter l'observation. La structure interne des particules est observée en congelant des suspensions de particules dans le milieu Tissue-Tek et en coupant les blocs gelés en tranches de 10µm d'épaisseur avec un cryotome (Leica CM1850, -20°C). Les tranches sont ensuite déposées sur une lamelle pour microscope puis colorées par une solution de bleu de méthylène.

8. Mesures de tensions de surface

Les solutions pour les mesures de tension de surface sont préparées de la même manière que pour les mesures de turbidités. Ces mesures de tensions de surface sont réalisées à l'aide d'un tensiomètre à goutte.

8.1. Description du tensiomètre à goutte

L'appareillage utilisé est un tensiomètre à goutte tombante (possibilité de goutte montante) de la marque Teclis Instruments (Modèle Tracker S). Un schéma du montage est présenté dans la figure ci-après :

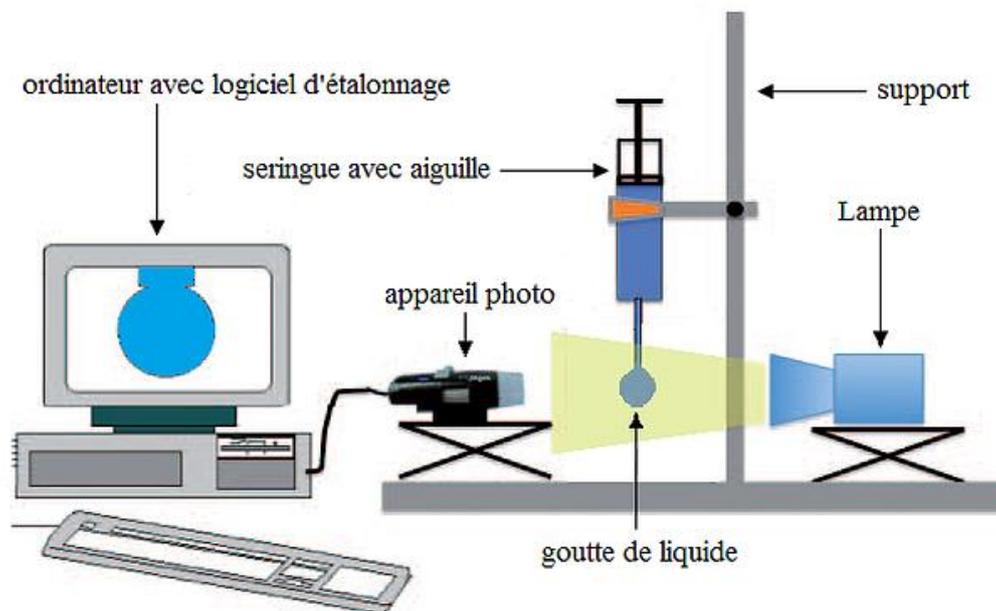


Figure 32 : Schéma représentant le système de mesure de tensiométrie à goutte pendante (261).

Pour résumer le fonctionnement de cet appareil, la solution à caractériser est insérée dans la seringue équipée d'une aiguille, qui est elle-même plongée dans la cuve contenant la seconde phase. Suivant les densités des deux phases, on a une goutte montante ou une goutte pendante. Dans le cas de l'étude présentée ici, seules des gouttes pendantes sont observées. Une source de lumière est ensuite envoyée vers la goutte et l'image résultante est capturée par une caméra puis transmise à l'ordinateur équipé d'un logiciel de traitement adéquat qui

calcule la tension de surface à partir de la forme de la goutte, à partir d'un modèle, comme nous allons le voir. La seringue permet de contrôler très précisément le volume de la goutte créée grâce à un petit moteur électrique. Il est également possible de faire varier le volume de la goutte au cours de la mesure pour explorer la rhéologie de l'interface.

8.2. Calcul de la tension de surface

Le calcul de la tension de surface se fait grâce à la numérisation de l'image du profil de la goutte. Deux phénomènes sont à prendre en compte dans ce calcul. Dans un premier temps, la tension de surface va former une résistance entre les deux phases ce qui va tendre à donner à la goutte une forme parfaitement sphérique. Dans un second temps, il y a l'effet de la gravité. Celle-ci va tendre à déformer la goutte en la tirant vers le bas et donc lui donner une forme plus allongée (assimilée à une forme de poire dans le cas de la goutte pendante). Dans les conditions où ces deux effets ont lieu en même temps et dans des proportions similaires, la forme des contours de la goutte ainsi que les angles de contact entre la goutte et son support peuvent être déterminés et permettent d'accéder à la tension de surface. C'est grâce à l'équation de Young-Laplace que la tension de surface est alors calculée :

$$-\Delta\rho gy + \gamma \frac{2}{R_0} = \gamma \cdot \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (27)$$

Avec $\Delta\rho$ qui représente la valeur absolue de la différence de masse volumique entre les deux phases, γ la tension de surface et g l'accélération de la pesanteur. Dans cet exemple, y représente l'ordonnée du point M (l'origine O étant prise au sommet de la goutte). R_0 est le rayon de courbure au sommet O de la goutte et R_1 et R_2 sont les rayons de courbure principaux au point M de coordonnées (x,y) .

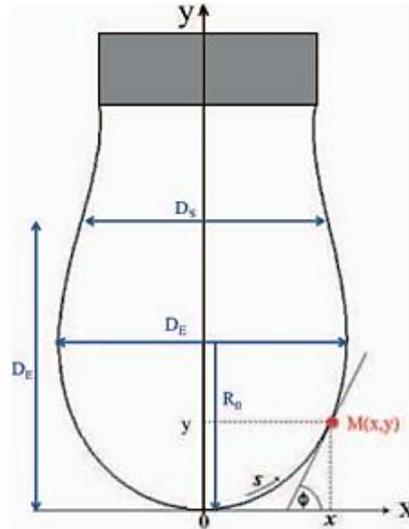


Figure 33 : Représentation schématique d'une goutte formée à la sortie d'une aiguille (262).

Dans le cas où l'on souhaite accéder aux paramètres rhéologiques de l'interface, celle-ci doit subir des déformations pour en calculer la répercussion sur la tension de surface. Ces déformations consistent en une variation de l'aire interfaciale (A) de la goutte (compression et dilatation). La réponse de l'interface à cette déformation va se manifester par des variations de la tension de surface. Un module viscoélastique (E) peut alors être calculé. Il traduit la proportionnalité entre une déformation (dA/A) et la tension de surface (en N/m) :

$$E = \frac{d\gamma}{\frac{dA}{A}} = \frac{d\gamma}{d\ln(A)} \quad (28)$$

Dans le cas d'une déformation sinusoïdale de fréquence ω et d'amplitude ΔA et d'une surface viscoélastique, un déphasage θ peut apparaître entre la déformation et la modification de la tension de surface. Le module viscoélastique devient alors un nombre complexe avec une partie réelle et une partie imaginaire. La partie réelle traduit l'élasticité de l'interface tandis que la partie imaginaire traduit la viscosité de l'interface :

$$E = |E| \cos \theta + i|E| \sin \theta \quad (29)$$

8.3. Réalisation de la mesure

Comme l'évoque l'équation 27, les valeurs des masses volumiques de chaque phase doivent être connues. Celles qui ne le sont pas sont déterminées à l'aide d'un pycnomètre.

Le système de mesure de la tension interfaciale est thermostaté à 30°C, au moins une demi-heure avant la réalisation de la mesure et le reste pendant toute la mesure. Les mesures réalisées ici sont toutes en goutte pendante avec dans la seringue, la phase aqueuse contenant les polymères et dans la cuvette, la phase organique. Le volume de la goutte est ensuite fixé en fonction des conditions expérimentales et la durée de la mesure est renseignée dans le logiciel. Chaque mesure est réalisée au moins deux fois pour s'assurer de la répétabilité. Les résultats sont exprimés en N/m et plus précisément en mN/m, unité standard de la tension interfaciale. Ce type de mesure où la surface de la goutte n'est pas modifiée pendant la mesure sera qualifié de « statique ». Dans le cas des mesures avec variation de la surface de la goutte, une variation sinusoïdale est appliquée à la goutte. Cette variation a une fréquence (période de 30 secondes) et une amplitude (1 μ l). Cette variation est appliquée pendant toute la durée de la mesure. Ce type de mesures est qualifié de « dynamique ».

9. Cinétiques de libération

Les mesures de cinétiques de libération se font avec un traceur modèle, le lysozyme. Les particules lyophilisées (10mg) sont imbibées avec une solution de lysozyme (6mg de lysozyme ajoutés au total) et laissées au repos pendant une nuit. Des particules témoins sont également préparées en ajoutant le même volume d'eau PPI. Un tube témoin ne contenant pas de particules mais uniquement la solution de lysozyme (6mg) est préparée.

Après une nuit de repos, 10ml de tampon PBS (pH =7) sont ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont immergés dans un bain-marie à 37°C, et soumis à agitation à l'aide d'un barreau aimanté.

A intervalles réguliers, 0,4ml du milieu sont prélevés et 1,6ml de tampon PBS sont ajoutés. La solution résultante est centrifugée à 6000rpm pendant 3 minutes pour éliminer les particules potentiellement présentes. L'absorbance de ces solutions est mesurée à 280nm. Le volume prélevé dans les tubes est compensé par l'ajout de 0,4ml de tampon PBS. Les mesures sont

réalisées deux fois par lot et deux lots sont utilisés dans les mêmes conditions. De cette manière, les différences intra et inter lots sont accessibles.

10. Analyse élémentaire

Les échantillons de particules lyophilisées sont analysés de manière à obtenir leur composition élémentaire massique (Flash EA 1112 series, Thermo Electron). A partir de ces résultats, il est possible de déterminer la teneur en HSA et en PGA des particules.

Le PGA ne contient aucun atome d'azote contrairement à l'HSA. Il est alors possible, à partir de la teneur en azote de l'échantillon de déterminer le ratio PGA/HSA. Le facteur de conversion basé sur le pourcentage massique de l'azote dans l'HSA (16%) est de 6,25 (234). Il est alors possible d'obtenir la teneur en PGA par soustraction.

Les pourcentages des deux polymères dans l'échantillon de particules lyophilisées sont déterminés par l'équation suivante :

$$\%HSA (m/m) = N\% * 6,25 \quad (30)$$

$$\%PGA(m/m) = 100\% - \%HSA \quad (31)$$

B. Résultats et discussion

Dans cette partie seront traités les différents effets observés lors de l'ajout de sels dans la phase aqueuse lors de la fabrication de microparticules par transacylation. La phase aqueuse utilisée lors de la fabrication des microparticules est composée des deux biopolymères (HSA et PGA) dissous dans l'eau pure ou l'eau salée. Le but est d'expliquer l'effet de ces sels sur la phase aqueuse et par conséquent sur les particules obtenues.

1. Effet de l'ajout de NaCl dans la phase aqueuse

1.1. Effets sur la turbidité des phases aqueuses.

La phase aqueuse contenant les deux polymères étant une émulsion eau dans eau, elle montre une turbidité naturelle qui va être modifiée en fonction de la concentration en sel du milieu.

Différentes combinaisons de ratios polymères/concentration en sel ont été testées pour comprendre l'effet du sel sur le système. Dans un premier temps, pour montrer que la turbidité observée est bien une conséquence de la séparation de phase, les turbidités des différents constituants seuls (HSA et PGA) sont mesurées pour une gamme de concentration en NaCl. Comme présenté sur la Figure 34, il apparaît que les solutions d'HSA ne montrent pas ou peu de turbidité, quelle que soit la concentration en sel. Concernant le PGA, les observations sont différentes. L'indépendance vis-à-vis de la concentration en sel n'est plus présente. Une légère hausse de la turbidité de la solution est observée lors du passage de 0 à 50 mM en NaCl. La valeur reste ensuite constante jusqu'à 1600mM de NaCl mais augmente de manière considérable lors du passage à 3200mM de NaCl. Cette augmentation drastique de la turbidité pourrait être due à une baisse de la solubilité du PGA en solution. Cela se confirme par l'observation d'un culot gélifié qui se collecte au fond des tubes lorsque la solution est laissée au repos quelques minutes.

Lorsque les deux polymères sont mélangés en solution, en l'absence de sel la turbidité résultante est bien plus importante que celle des constituants seuls et même supérieure à leur somme. Cela montre bien la présence d'une séparation de phase. Lorsqu'on ajoute des quantités croissantes de sel, la turbidité varie différemment de celle d'une solution des polymères seuls. Une augmentation de la valeur a lieu entre 0 et 50 mM de NaCl, suivie d'une diminution jusqu'à 1600mM. La diminution de la turbidité observée pourrait traduire une meilleure homogénéité de la phase aqueuse, ce qui équivaldrait à une plus faible séparation de phase. Une nouvelle augmentation de la turbidité pour 3200mM de NaCl traduit à nouveau la baisse de la solubilité du PGA pour cette concentration en NaCl.

Ces mêmes phases aqueuses ont été observées au microscope. La Figure 36 montre les images obtenues. On peut observer dans la plupart des échantillons la présence de petits objets qui sont identifiés comme des gouttelettes d'une phase aqueuse dans l'autre (résultat de la séparation de phase). Cependant, le nombre et la taille de ces gouttelettes ne sont pas toujours les mêmes en fonction de la concentration en NaCl dans le milieu. En effet, pour 0mM et 50mM de NaCl, il semble que les objets soient très petits et très nombreux, donnant l'impression de « brouillard ». A partir de 200mM de NaCl, les objets sont distinguables car plus gros et moins nombreux. Leur taille semble augmenter jusqu'à 800mM de NaCl. Au-delà de 800mM, le nombre d'objets chute rapidement jusqu'à n'en voir presque plus à 1600mM.

Enfin, pour 3200mM de NaCl, de gros objets apparaissent, qui pourraient être des grains de PGA mal hydratés et donc visibles au microscope.

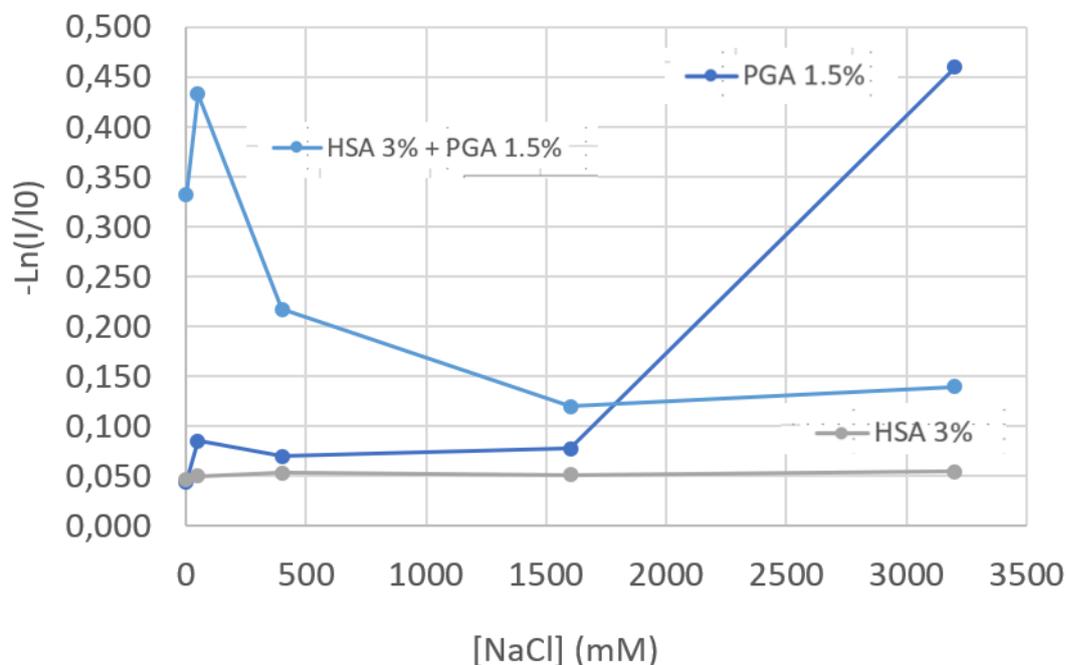


Figure 34 : Turbidités des solutions de polymères en fonction de la concentration en NaCl.

Ces observations sont cohérentes avec les mesures de turbidité réalisées précédemment. En effet, la baisse de la turbidité au-delà de 50mM est cohérente avec la taille plus importante des gouttelettes ainsi que leur plus petit nombre. Le minimum de turbidité est observé à 1600mM, là où le nombre de gouttelettes est minimum. Enfin, le maximum de turbidité, pour 3200mM correspond à l'apparition des gros objets.

Pour des questions de faisabilité (faible viscosité et turbidité en dessous du maximum de détection du spectromètre), la majorité des mesures est faite pour les concentrations en polymères suivantes : 3% en HSA et 1,5% en PGA. Cependant, de manière à généraliser les observations présentées ci-dessus, des mesures de turbidité pour d'autres concentrations en polymères ont été réalisées. Comme le montre la Figure 35, la tendance observée pour 3% en HSA et 1,5% en PGA reste la même, indépendamment du ratio de polymères. Il semble également que la quantité de PGA dans le système affecte particulièrement la turbidité globale de la solution aqueuse. En effet, plus la quantité de PGA est importante, plus la

turbidité est importante. Dans le cas où le PGA est en très faible quantité (0,5%), la turbidité observée semble être celle de l'HSA et le comportement est linéaire. Au-delà de cette concentration en PGA, le comportement décrit ci-dessus est de nouveau présent et s'accroît avec la quantité de PGA.

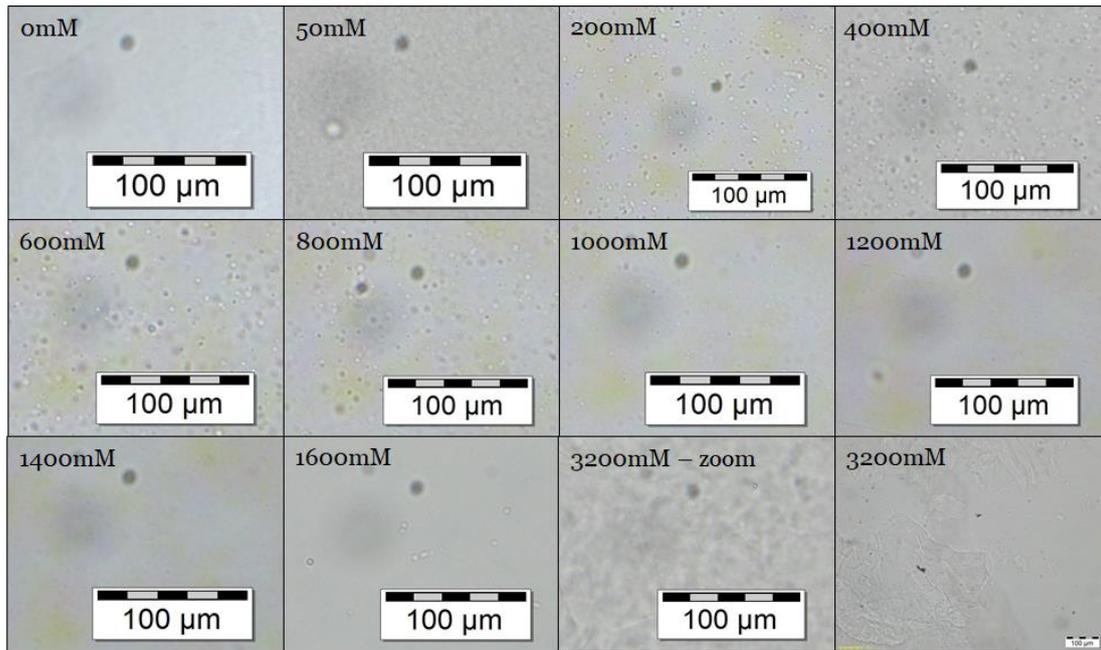


Figure 36 : Photographies des phases aqueuses au microscope en fonction de la concentration en NaCl (HSA 3% - PGA 1,5%)

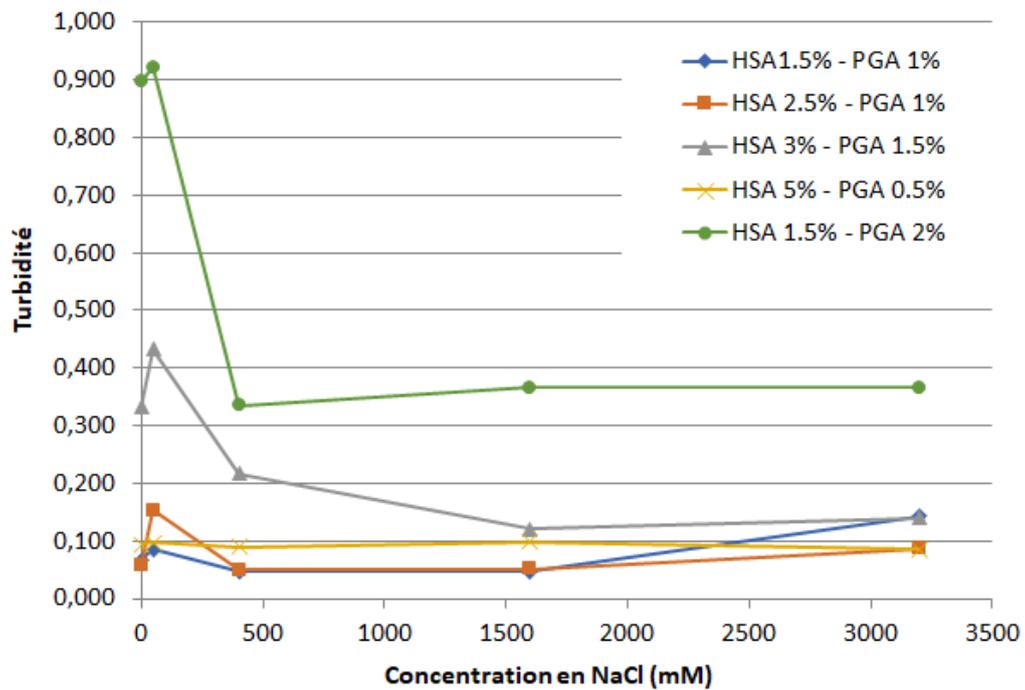


Figure 35 : Turbidités des phases aqueuses en fonction des concentrations en polymères.

1.2. Effet sur la viscosité des phases aqueuses

De la même manière que pour la turbidité, la viscosité des phases aqueuses a été mesurée. Il est possible, à l'œil nu, de détecter des différences de viscosité entre les échantillons à différentes concentrations en NaCl. La viscosité des constituants seuls et en mélange a été évaluée. Deux types de mesures ont été réalisées. La première consistait en un suivi de la viscosité et de la tension de cisaillement lors d'un cycle de vitesse de cisaillement (Figure 37). La deuxième était la mesure de la valeur de viscosité pour la vitesse maximum de cisaillement (Figure 38). Comme pour la turbidité, le comportement des constituants seuls est très différent du comportement du mélange. Lorsque l'HSA est seule en solution, la viscosité ne dépend pas de la concentration en NaCl, elle est constante et proche de celle de l'eau (1 mPa.s) (235). De plus le comportement lors du cycle de mesure est le même pour toutes les concentrations en NaCl et un fluide newtonien est observé (les artefacts de début de mesure peuvent être liés à la présence de bulles d'air dans la géométrie ou bien à une difficulté de rotation du rotor pour les faibles vitesses). Lorsque le PGA est seul en solution, on peut voir une influence de la concentration en NaCl sur la viscosité. En effet, les courbes obtenues pour différentes concentrations de NaCl ne sont pas superposables. Le comportement observé n'est pas newtonien car la variation de viscosité lors de l'augmentation du gradient n'est pas la même que lors de sa diminution (thixotropie) (236). La viscosité des solutions commence par diminuer entre 0 et 200mM de NaCl pour ensuite augmenter à nouveau jusqu'à 1600mM de NaCl. Une diminution de la valeur est de nouveau observée entre 1600mM et 3200mM de NaCl. Comme pour la turbidité, cette baisse peut être expliquée par la diminution de la solubilité du PGA pour cette forte concentration en NaCl. Lorsque les deux biopolymères sont en mélange, la viscosité des solutions est supérieure à celle des polymères seuls, ce qui montre qu'il y a une interaction entre eux. L'allure de la courbe est la même que celle pour le PGA seul mais avec des valeurs de viscosité supérieures. Un autre changement de comportement qui peut être observé pour le mélange est la disparition de la thixotropie. Seule la courbe à 3200mM de NaCl est différente des autres mais encore une fois, cela peut être expliqué par la baisse de solubilité du PGA pour cette concentration en NaCl.

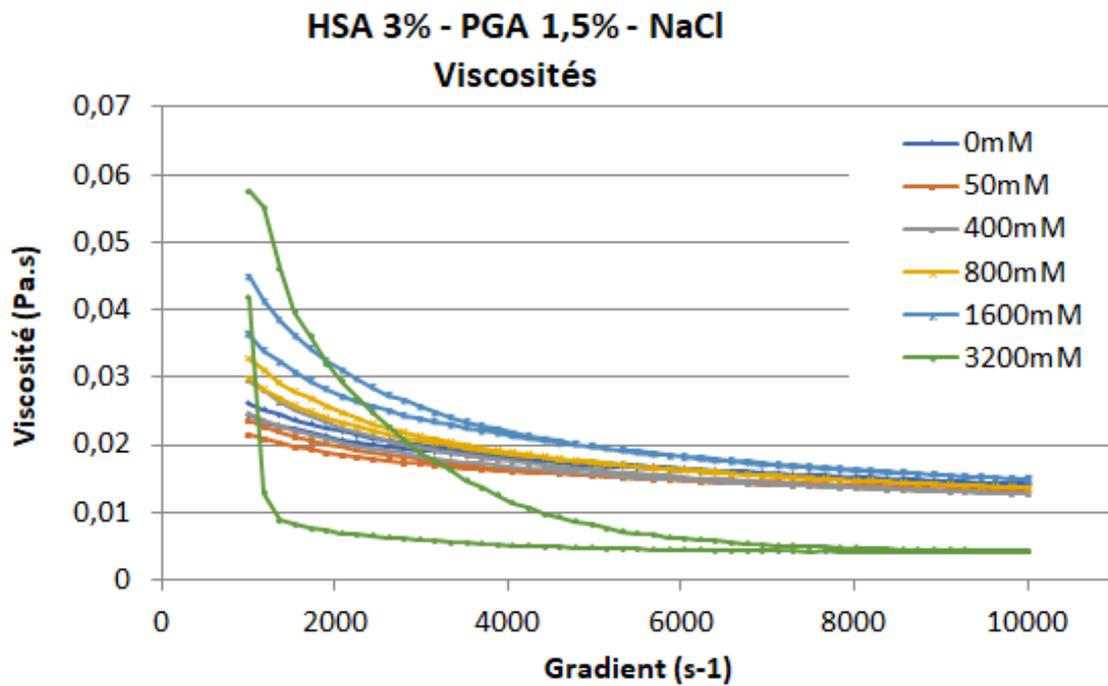


Figure 37 : Viscosités des phases aqueuses en présence de NaCl lors d'un cycle de vitesses de cisaillement.

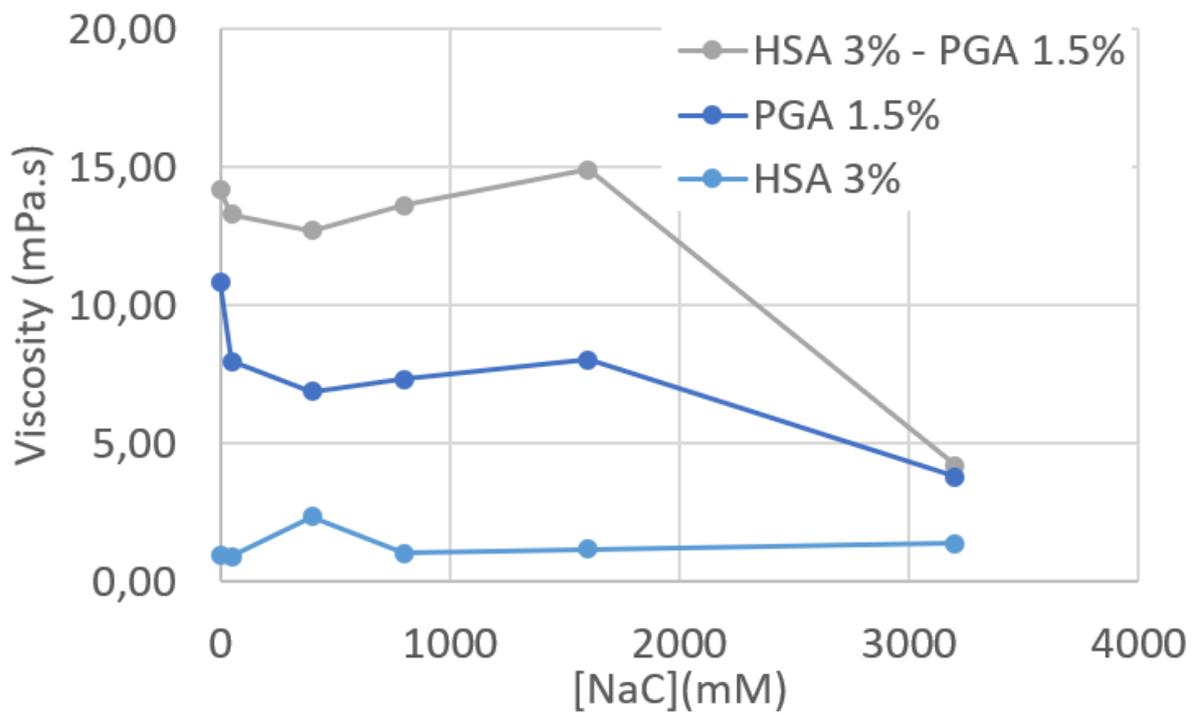


Figure 38 : Viscosités des solutions de polymères en fonction de la concentration en NaCl.

On peut donc voir que la présence de NaCl a une influence sur la viscosité de la phase aqueuse. Il est possible que la présence d'ions écrante les interactions électrostatiques répulsives et favorise le mélange des polymères (237). Ces observations sont cohérentes avec celles faites sur la turbidité.

1.3. Effet sur les propriétés interfaciales des polymères

Les deux polymères présents dans la phase aqueuse présentent des propriétés tensioactives plus ou moins importantes. Des mesures de tensiométrie à l'interface entre la phase aqueuse et le myristate d'isopropyle ont été réalisées de manière à déterminer si la présence de NaCl pouvait avoir une influence sur le comportement interfacial des polymères dans la phase aqueuse. Les valeurs de tensions interfaciales sont mesurées en mode statique pour les constituants seuls et en mélange, de manière à avoir accès aux contributions respectives des polymères. Il est ainsi possible de voir que l'HSA a une activité tensioactive plus importante que le PGA (Figure 40). Lorsque les deux polymères sont mélangés, il semble que ce soit la capacité tensioactive de l'HSA qui prend le dessus (valeur de tension de surface du mélange égale à celle de l'HSA seule). En revanche, la présence de NaCl dans le milieu ne change pas les valeurs de tension de surface (ni pour l'HSA, ni pour le PGA, ni pour le mélange). La plus ou moins intense séparation de phase entre les polymères en fonction de la concentration en sel semble donc ne pas influencer le comportement à l'interface.

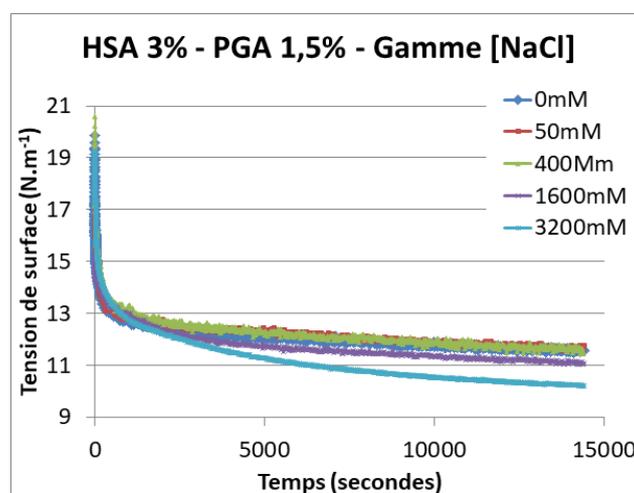


Figure 39 : Tension interfaciale entre la phase aqueuse et le myristate d'isopropyle en fonction de la concentration en NaCl.

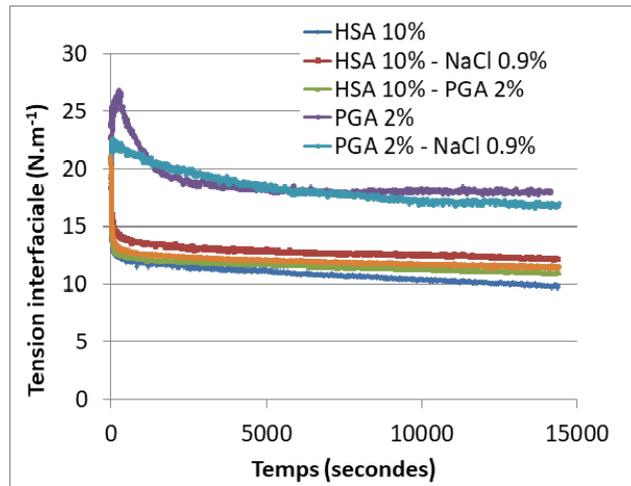


Figure 40 : Tensions interfaciales entre le myristate d'isopropyle et différentes phases aqueuses.

Pour obtenir les valeurs de modules d'élasticité et de viscosité, des mesures en mode dynamique (goutte pendante oscillante) ont été réalisées (238). On peut voir ici que cette fois la présence de NaCl a une influence sur l'élasticité mais aussi sur la viscosité de l'interface. Lorsque l'HSA est seule, l'élasticité de l'interface augmente avec la concentration en sel (de 15 à 25 mN/m). En revanche la viscosité de l'interface semble moins affectée (variations entre 4 et 7 mN/m). Lorsque le PGA est seul, il y a également une influence de la concentration en NaCl. En ce qui concerne l'élasticité, celle-ci diminue lorsque la concentration en NaCl augmente. Cela est cohérent avec la baisse de solubilité du PGA observée pour les fortes concentrations en NaCl. La même tendance est observée pour la viscosité dans le cas du PGA seul. Lorsque les deux polymères sont en mélange, le comportement de la solution est, encore une fois, différent de celles comportant les constituants seuls. Dans le cas de l'élasticité, on observe une indépendance de celle-ci à la concentration en NaCl. Seule la courbe pour 3200mM NaCl est différente (ici encore, sûrement à cause de la baisse de solubilité du PGA). Dans le cas de la viscosité, celle-ci diminue avec l'augmentation de la concentration en NaCl. La concentration en sel permet donc de varier les propriétés rhéologiques de l'interface, ce qui va vraisemblablement avoir des répercussions sur la dispersion de la phase aqueuse en émulsion, et donc sur les propriétés des particules obtenues (239).

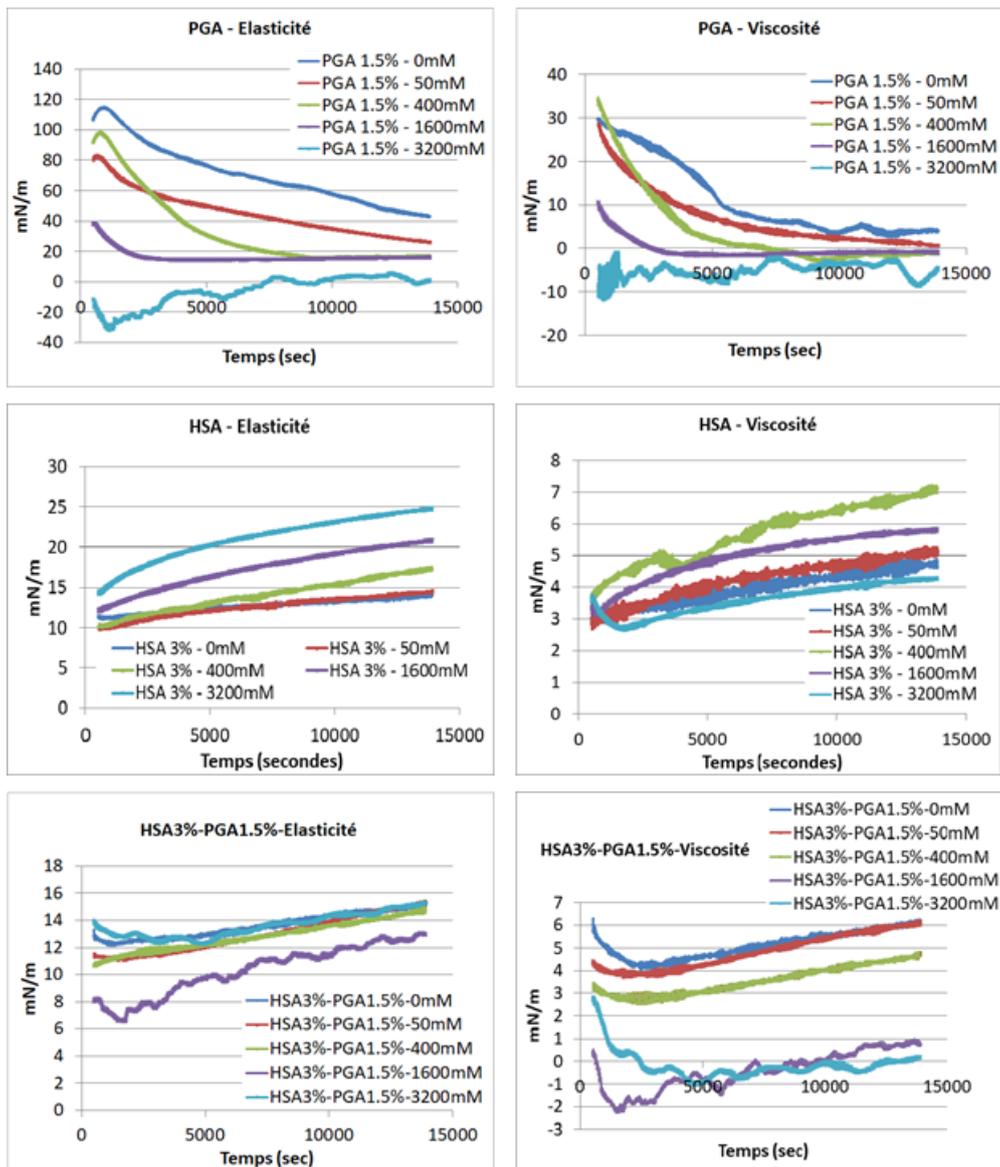


Figure 41 : Elasticités et viscosités de l'interface pour différentes solutions de polymères en fonction de la concentration en NaCl.

1.4. Influence sur la faisabilité des microparticules

Il a été vu précédemment que l'ajout de NaCl dans la phase aqueuse contenant les polymères avait pour effet de diminuer la séparation de phases observée (montré par les mesures de turbidité et de viscosité). A partir de cette observation, nous avons pensé que ce comportement pouvait servir à fabriquer des particules dans des conditions où cela est normalement impossible. En effet, Imane HADEF (1) a montré dans sa thèse qu'il n'était pas possible d'obtenir de microparticules pour des concentrations en polymères trop faibles (en-

dessous de 5% d'HSA et 2% de PGA). Des essais à des concentrations inférieures à celles annoncées ci-dessus ont été réalisés en présence de NaCl. Le tableau ci-après résume les résultats de ces essais de microparticules. On peut trouver, sur fond vert, les conditions pour lesquelles il est possible d'obtenir des microparticules sans l'ajout de NaCl. Au contraire, en orange, on retrouve les conditions pour lesquelles il est nécessaire d'ajouter du NaCl pour obtenir des microparticules.

4%						
3%						
2%						
1,5%						
1%						
↑PGA	1,5%	2,5%	5%	7,5%	10%	20%
→HSA						

Figure 42 : Coupes de particules obtenues pour différentes concentrations en polymères. En vert, la partie où des particules peuvent être obtenues sans l'ajout de NaCl (résultats I. HADEF). En orange, partie où l'ajout de NaCl est nécessaire à l'obtention de particules (nouveaux résultats).

Le résultat de ces expériences montre bien que l'ajout de NaCl dans la phase aqueuse permet une meilleure colocalisation des polymères, ce qui a pour effet d'augmenter la zone de faisabilité des microparticules. D'autre part, le fait de changer la concentration en NaCl va également modifier la structure interne des microparticules. On peut observer le passage d'une structure dentelée à une structure vésiculaire juste en changeant la concentration en NaCl. La figure suivante montre ce changement en fonction de la concentration en NaCl.

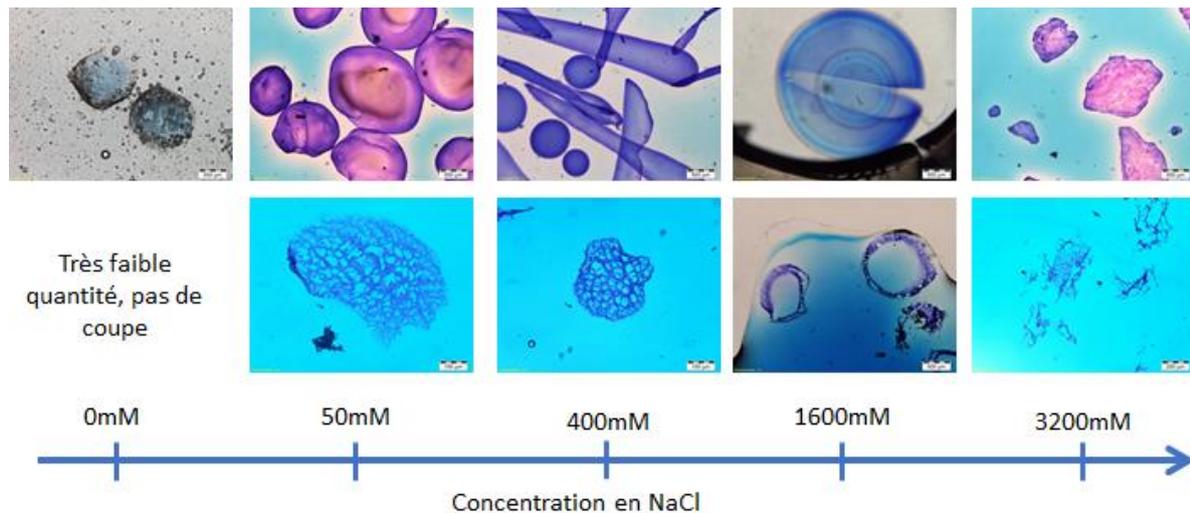


Figure 43 : Comparaison des particules et de leurs coupes pour différentes concentrations en NaCl.
Cas en-dessous de la limite habituelle de faisabilité (HSA 1,5% - PGA 3%).

On peut voir ici qu'en l'absence de NaCl, l'obtention de microparticules n'est pas favorable. Les objets visibles sont très mal définis et en très faible quantité (quelques dizaines seulement). Les premières particules sont, dans ce cas, visibles à une concentration en NaCl de 50mM.

L'augmentation de la concentration en sel améliore l'aspect des particules et les rend bien sphériques pour 1600mM de NaCl. Au-delà, on observe des fragments informels de gel.

1.5. Influence sur la structure interne des particules

Comme le montre les points précédents, la présence de NaCl dans la phase aqueuse modifie son comportement. Il a été montré que l'ajout de NaCl permettait d'augmenter la zone de faisabilité des particules. Cependant, que se passe-t-il lorsque l'on ajoute du NaCl dans une phase aqueuse qui permet déjà d'obtenir des microparticules ? On peut attendre un changement dans la structure interne des particules obtenues. Des particules avec les mêmes concentrations en polymères mais des concentrations différentes en NaCl ont été préparées pour étudier ce point.

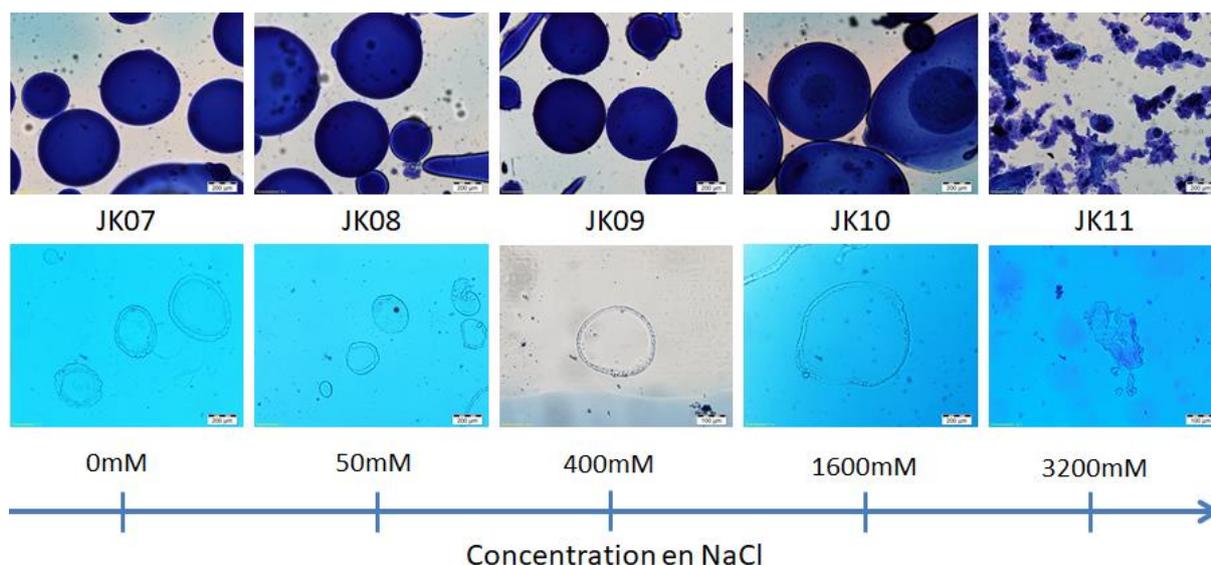


Figure 44 : Comparaison des particules et de leurs coupes pour différentes concentrations en NaCl.
Cas au-dessus de la limite habituelle de faisabilité (HSA 20% - PGA 3%).

Comme le montrent les images, à ces concentrations en polymères, la forme des particules n'est pas modifiée par la présence de NaCl. On obtient dans tous les cas des particules sphériques et bien distinctes. Seules les particules obtenues pour 3200mM de NaCl présentent une forme différente, sûrement à cause de la baisse de solubilité du PGA pour ces fortes concentrations salines. Les mêmes observations sont faisables avec les images de coupes de microparticules. Toutes les particules (excepté pour 3200mM de NaCl) présentent une structure vésiculaire avec une membrane extérieure uniforme. Cela laisse penser que le NaCl n'agit pas sur la structure des microparticules dans le cas où la concentration en polymères permet la fabrication de particules en l'absence de sel.

1.6. Analyse élémentaire des particules pour différentes concentrations en NaCl

Voyant que dans le cas des faibles concentrations en polymères, la concentration en NaCl avait une influence sur la structure interne des particules, nous avons pensé qu'elle pouvait avoir une influence sur le ratio des polymères qui constituent effectivement le réseau. Il est possible que le NaCl, en modifiant les interactions entre les polymères, modifie la constitution de la membrane. Une analyse élémentaire est alors réalisée pour déterminer les pourcentages

relatifs de chacun des polymères dans la membrane. La méthode utilisée pour le calcul est décrite dans les matériels et méthodes (page 117).

Deux lots de particules sont préparés et deux mesures par lot sont réalisées. Dans le cas où la concentration en NaCl est de 50mM, une teneur en HSA moyenne de $36,1\% \pm 0,13\%$ est mesurée. Pour une concentration en NaCl de 2041mM, la teneur moyenne est de $39,7\% \pm 0,24\%$. Ces différences sont significatives (test de Student, $P = 0,05$).

Le fait d'ajouter du NaCl dans le milieu permet donc d'étendre le domaine de faisabilité des particules mais permet également de modifier la composition de la membrane des particules. L'ajout de NaCl dans le milieu agit très certainement sur les interactions électrostatiques entre les deux polymères chargés négativement (147). Passer de 50mM à 2041mM permet d'augmenter la quantité d'HSA au sein du réseau covalent.

1.7. Cinétiques de libération pour des particules avec différentes concentrations en NaCl

La composition de la membrane étant influencée par la présence plus ou moins importante de NaCl, on peut s'attendre à ce que les propriétés des particules soient affectées. Nous avons déjà pu voir que leur forme et leur structure interne en étaient dépendants. Un des paramètres clé qu'il reste à évaluer est la capacité des particules à encapsuler et libérer un actif. Dans le cas présent, un traceur modèle sera utilisé : le lysozyme. Les cinétiques de libération sont mesurées pour les particules préparées avec 50mM et 2041mM de NaCl et comparées dans la Figure 45. On voit que dans les deux cas, 80% du traceur est libéré en environ 2 heures et 8 heures ne suffisent pas à libérer totalement le traceur.

Les deux cinétiques sont très similaires et ne sont pas significativement différentes (test de Student, $P = 0,05$). Les différences de structure interne et de composition de la membrane n'étant pas drastiquement différentes, cela ne semble pas avoir de réel impact sur la capacité des particules à plus ou moins retenir le traceur.

En revanche ces mesures montrent que le fait d'encapsuler un traceur est bien possible avec les particules préparées dans des conditions défavorables. Le fait de se situer dans la zone de faisabilité atteignable uniquement en présence de sel n'est pas un frein à l'encapsulation. De

plus, la cinétique obtenue permet d'envisager une utilisation pour une libération contrôlée par voie orale par exemple.

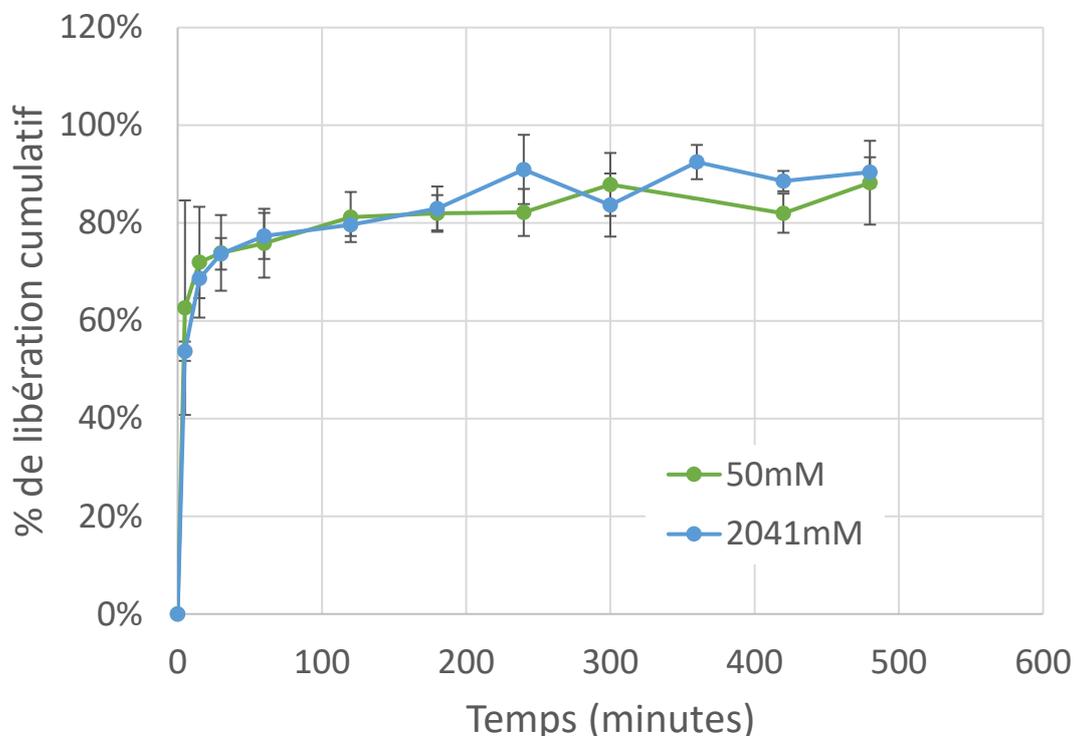


Figure 45 : Cinétiques de libération pour des particules en présence de différentes concentrations en NaCl.

2. Effet de l'ajout de KCl dans la fabrication de microparticules par transacylation en émulsion

De manière à mieux interpréter l'influence d'un composant dans la phase aqueuse, un autre sel que le NaCl a été testé. En effet, le KCl est très proche du NaCl, seule la taille du cation change (K^+ étant plus gros que Na^+) (165). Le KCl a donc été ajouté de la même manière à la phase aqueuse et dans les mêmes concentrations. Comme la taille de l'ion est modifiée, le comportement induit par le KCl dans la phase aqueuse peut être différent de celui induit par le NaCl.

2.1. Influence sur la turbidité de la phase aqueuse

Comme pour le NaCl, la turbidité des phases aqueuses contenant du KCl a été mesurée. Les valeurs obtenues pour le KCl sont très proches de celles obtenues pour le NaCl et dans les mêmes ordres de grandeurs. De plus, les mêmes tendances sont observées sur la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** (pic de turbidité pour 50mM, baisse de la valeur jusqu'à 1600mM puis légère augmentation jusqu'à 3200mM).

Si on suit la série de Hofmeister, on peut voir que le KCl a un effet "salting out" plus important que le NaCl, ce qui expliquerait le fait qu'aucune particule ne puisse être obtenue pour une concentration de 3200mM en KCl, contrairement au NaCl (165). Tester d'autres sels composés d'ions différents pourrait permettre de comprendre plus encore l'effet des sels (et des ions) sur le système et sur les particules.

2.2. Influence sur la faisabilité des microparticules

Comme pour le NaCl, l'ajout de KCl permet d'obtenir des microparticules pour des concentrations en polymères où cela est impossible sans ajout de sel. Cependant, là où pour le NaCl on peut obtenir des particules pour 400, 1600 et 3200mM, dans le cas du KCl, cela n'est possible que pour 400 et 1600mM. Aucune trace de particule n'est observée pour des concentrations au-dessus ou en-deçà.

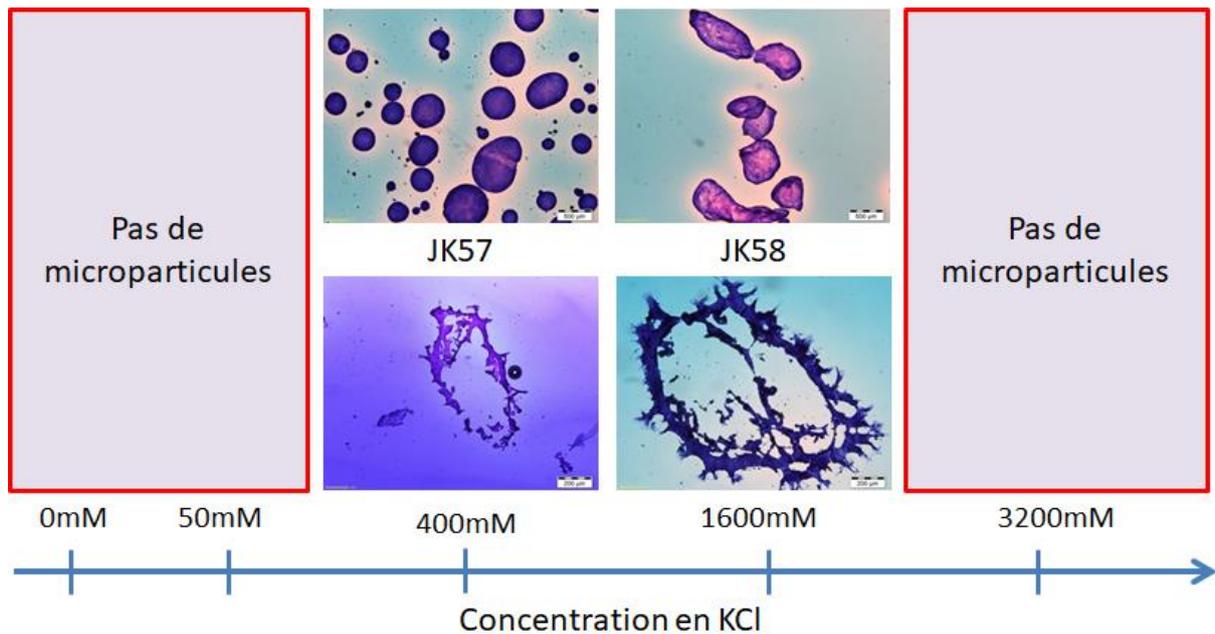


Figure 46 : Particules obtenues pour différentes concentrations en KCl. Cas en-dessous de la limite de faisabilité (HSA 3% - PGA 1,5%).

Le KCl possède également la faculté de rendre possible la fabrication de particules pour de faibles concentrations en polymères. En revanche, son effet n'est pas tout à fait le même. L'aspect des microparticules préparées avec 1600mM en KCl (surface irrégulière, aspect rugueux, membrane dentelée) ressemble fortement à celui des microparticules avec 3200mM de NaCl. Cela pourrait indiquer que le KCl fait baisser la solubilité du PGA pour de plus faibles concentrations que le NaCl.

2.3. Effet sur la structure interne des microparticules

Comme le KCl ne semble pas agir tout à fait de la même façon que le NaCl, la question de son influence sur la structure des microparticules se pose alors. Deux séries de microparticules ont été fabriquées pour les mêmes concentrations en polymères et en sel de manière à comparer leurs structures.

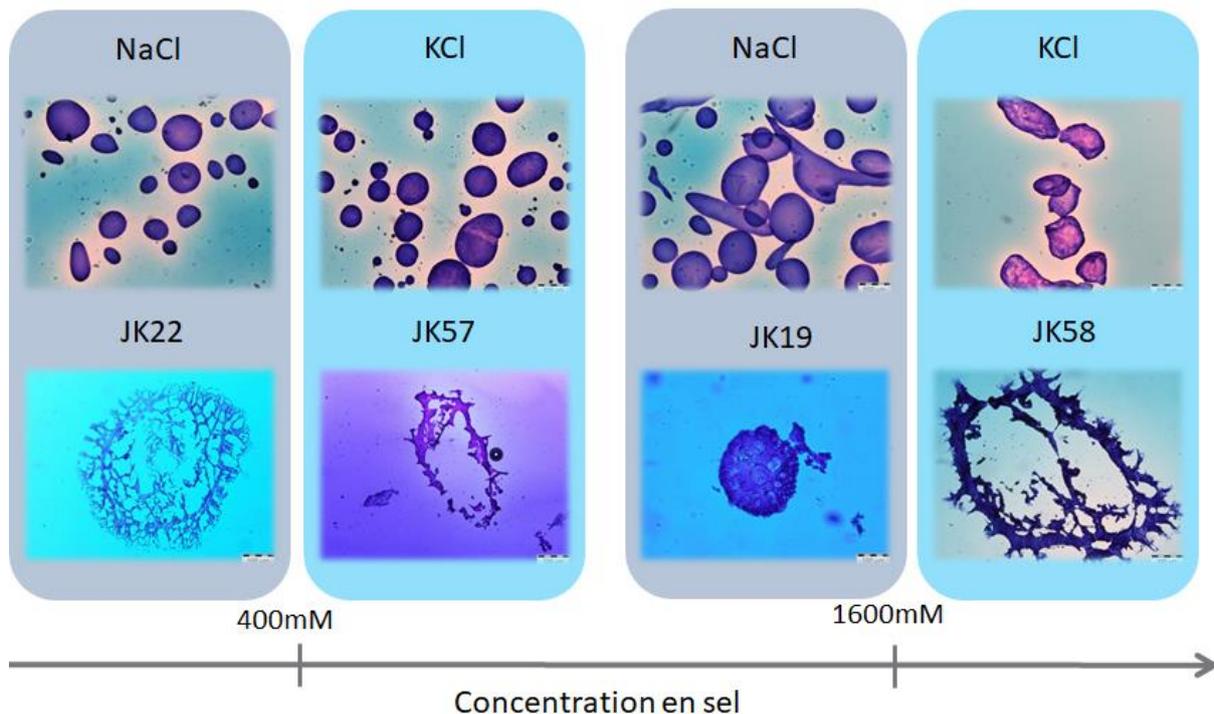


Figure 47 : Comparaison des particules obtenues avec NaCl et KCl (HSA 3% - PGA 1,5%).

On remarque alors que la structure des microparticules semble légèrement différente en fonction de la nature du sel utilisé. En effet, dans le cas du KCl, il semble que les structures soient plus vésiculaires qu'avec le NaCl. Cependant, dans les deux cas on observe une structure dentelée.

3. Effet de l'ajout d'autres sels monovalents dans la fabrication de microparticules

Après avoir vu l'influence du NaCl et du KCl sur les particules et leur faisabilité, nous avons poussé l'étude vers d'autres sels, de manière à essayer de comprendre le mécanisme des sels dans le processus. Deux autres sels ont donc été testés, le chlorure de lithium (LiCl) et l'iodure de potassium (KI). De cette manière, trois cations monovalents différents sont testés avec le même contre-ion (Na^+ , K^+ et Li^+ avec Cl^-). Nous avons également utilisé du KI pour comparer deux anions avec le même cation (I^- et Cl^- avec K^+). De la même manière que pour les autres

sels, la turbidité des phases aqueuses ainsi que leurs aspects ont été observés. La faisabilité des particules avec ces sels a été étudiée également.

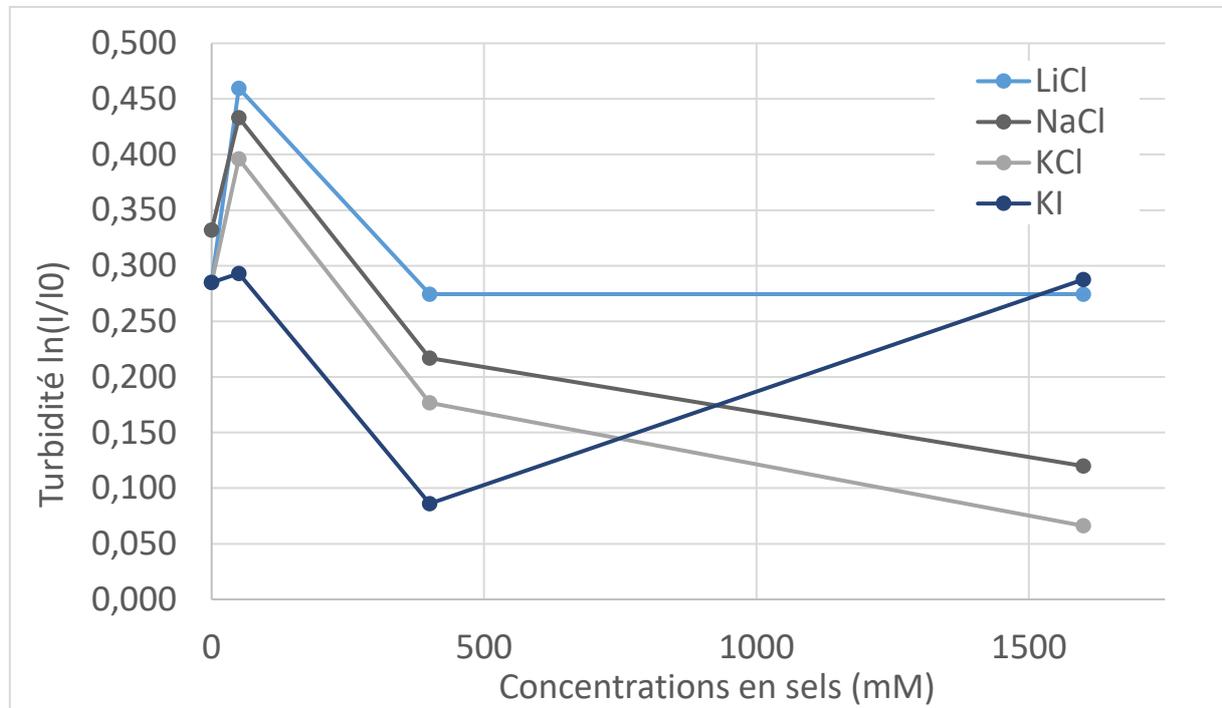


Figure 48 : Turbidités des phases aqueuses pour différentes concentrations en sels monovalents.

On peut remarquer que la nature du sel n'influence que très peu la tendance de la courbe de la turbidité. On observe dans tous les cas un pic de valeur pour les solutions contenant 50mM de sel puis une diminution de la turbidité pour 400mM. Enfin on observe une stabilisation ou une légère diminution de la turbidité pour NaCl, KCl et LiCl. Seule la phase aqueuse contenant KI se comporte un peu différemment. On observe une forte augmentation de la turbidité pour 1600mM. Cela peut être dû au fait que ce sel favorise plus la désolvation des polymères en solution.

Chapitre 2 : Influence de l'ajout de sels sur la fabrication de microparticules

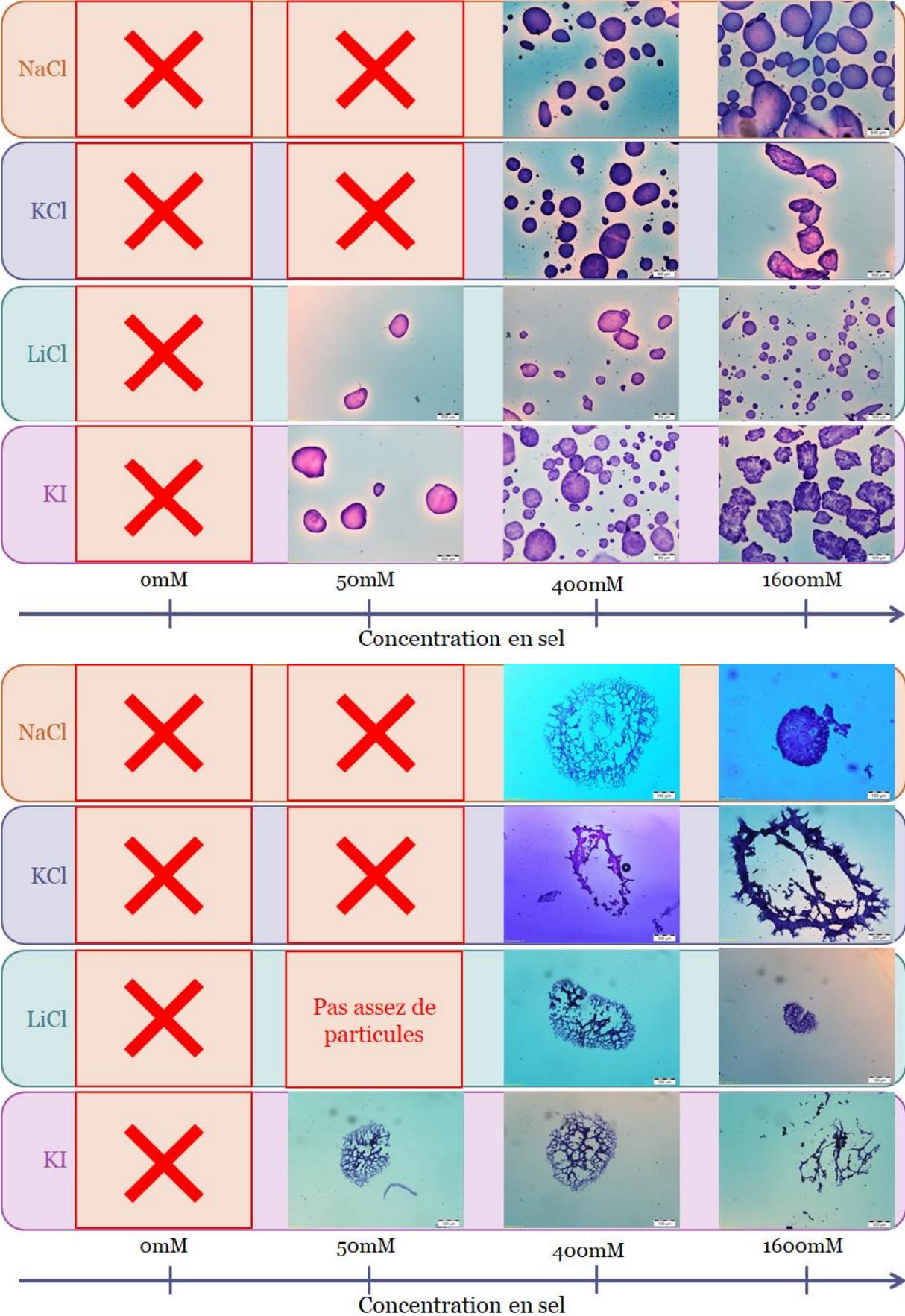


Figure 49 : Comparaisons de particules et leurs coupes pour les différents sels monovalents.

On peut voir ici que tous les sels utilisés permettent d'augmenter la zone de faisabilité des particules pour les faibles concentrations en polymères. Dans tous les cas, pour une concentration en sels de 400mM des particules sont obtenues. Dans le cas du LiCl et du KI, des particules sont même obtenues à partir de 50mM, cependant le rendement est vraiment très faible. On remarque également des différences dans l'aspect des particules en fonction de la nature du sel. Dans les cas du NaCl et du LiCl, les particules ont un aspect plutôt lisse et homogène avec des particules mal définies mais globalement sphériques. Au contraire, pour le KCl et le KI, on observe des particules à l'aspect rugueux voire granuleux, bien que globalement sphérique également. La plus grosse différence observable est pour la concentration 1600mM où, pour KI et KCl, les particules ne sont plus sphériques du tout et ont un aspect encore plus granuleux. A l'opposé, pour NaCl et LiCl, les particules conservent leur aspect lisse. En termes de structure interne, les sels ne semblent pas avoir une forte influence sur la formation du réseau. En effet, toutes les coupes de particules montrent un réseau dentelé plutôt fin (au moins à 400mM de sel). Seuls les lots préparés avec le KCl présentent un réseau un peu moins défini mais dont la structure n'est pas fondamentalement différente des autres. On voit donc une différence d'influence des sels sur les particules, qui peuvent être reliées à la série de Hofmeister.

Il est possible de corrélérer ces informations avec l'équation de Jones-Dole qui donne une indication du caractère chaotrope ou kosmotrope des ions. L'équation de Jones-Dole est la suivante :

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + AC^{\frac{1}{2}} + BC \quad (32)$$

Avec η et η_0 les viscosités de la solution et du solvant respectivement, A un coefficient qui décrit l'impact des interactions électrostatiques (souvent négligé), B le coefficient de Jones-Dole et C la concentration du soluté. Chaque ion se voit alors attribuer une valeur de B en fonction de son comportement (165). Les ions chaotropes ont une valeur de B négative tandis que les ions kosmotropes ont une valeur de B positive (Figure 50). Nous avons alors calculé la valeur globale pour chaque sel en faisant la somme des coefficients de l'anion et du cation et nous avons représenté la turbidité des solutions en fonction de ces valeurs pour tous les chlorures. Le résultat est présenté dans la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

Cations	B	Anions	B
Mg ²⁺	0.385	PO ₄ ³⁻	0.590
Ca ²⁺	0.285	CH ₃ CO ₂ ⁻	0.250
Ba ²⁺	0.22	SO ₄ ²⁻	0.208
Li ⁺	0.150	F ⁻	0.10
Na ⁺	0.086	HCO ₂ ⁻	0.052
K ⁺	-0.007	Cl ⁻	-0.007
NH ₄ ⁺	-0.007	Br ⁻	-0.032
Rb ⁺	-0.030	NO ₃ ⁻	-0.046
Cs ⁺	-0.045	ClO ₄ ⁻	-0.061
		I ⁻	-0.068
		SCN ⁻	-0.103

Figure 50 : Coefficients de Jones-Dole des ions usuels.

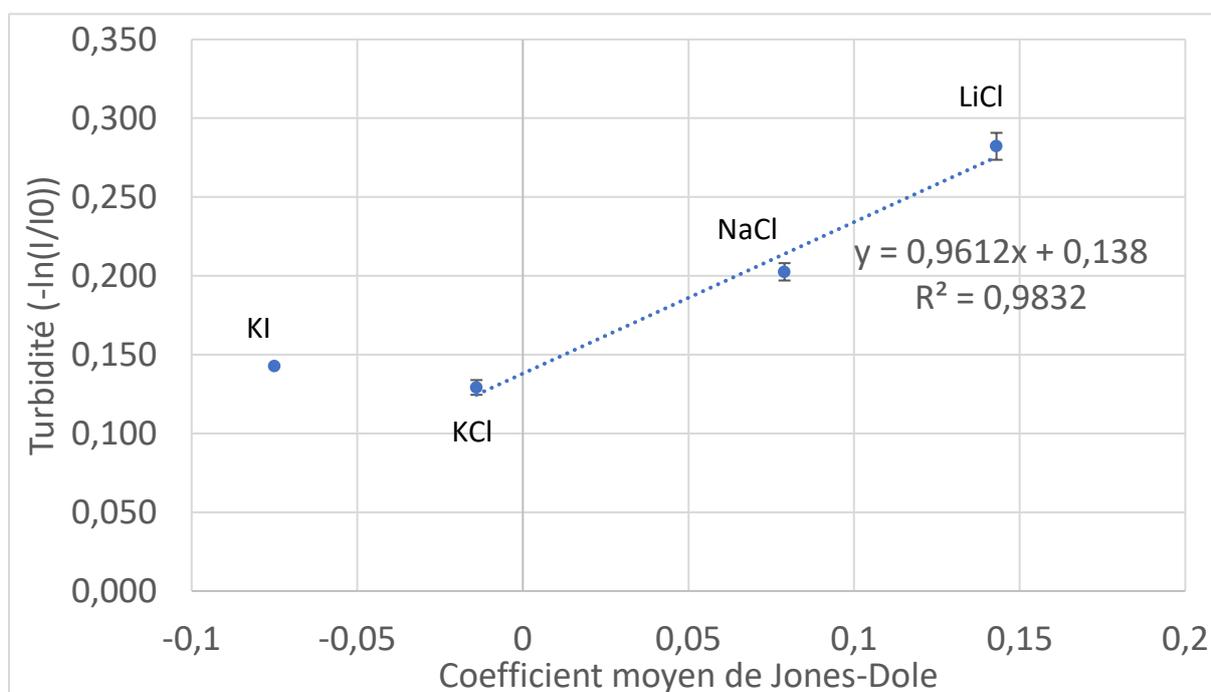


Figure 51 : Corrélation entre la turbidité des solutions et le coefficient de Jones-Dole des chlorures (HSA 3% - PGA 1,5% - 400mM).

On peut alors observer une corrélation entre la turbidité des solutions et le coefficient de Jones-Dole du sel considéré. Plus l'ion est kosmotrope, plus la turbidité résultante dans la phase aqueuse est importante et par conséquent, plus la séparation de phase est importante.

La raison pour laquelle le lithium est responsable de la plus haute turbidité n'est pas clairement expliquée mais plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Nous avons pu voir

précédemment que la présence d'ions, et donc de charges dans le système, pouvait écranter les répulsions électrostatiques et réduire la séparation de phase. Cependant, il semble que chaque ion puisse agir différemment, K^+ montrant la meilleure réduction de turbidité. La façon dont l'ion agit sur le polymère peut avoir pour origine différents phénomènes. Les trois cations sont capables de s'associer avec certains groupes fonctionnels présents sur le squelette des polymères comme les groupements carboxylates ou des zones de surface anioniques (240). Cette association peut être directe ou par l'intermédiaire de molécules d'eau. Dans le premier cas, la liaison directe par des interactions électrostatiques permet d'augmenter la solubilité du polymère (241). Li^+ étant l'ion avec la plus forte densité de charge, il est le plus susceptible de se comporter comme tel. Cependant, la turbidité la plus importante est observée dans le cas du $LiCl$, avec une turbidité très proche de celle en l'absence de sel. Cela impliquerait que les polymères sont mieux solubilisés puisqu'il est possible de fabriquer des particules grâce au $LiCl$, mais pour autant, cela n'a pas d'effet notable sur la séparation de phase.

Les deux autres ions sont plus susceptibles d'interagir avec les polymères via des molécules d'eau de la couche d'hydratation. Si une molécule d'eau est directement liée au polymère par une liaison hydrogène, le cation sera capable d'attirer la densité électronique vers l'atome d'oxygène et laisser l'atome d'hydrogène de la molécule d'eau plus électropositif. Cela résulte en un renforcement de la liaison hydrogène entre l'eau et le polymère et augmente sa solubilité (241).

Même si les trois cations sont considérés comme des kosmotropes, leurs propriétés intrinsèques sont différentes. La taille de ces trois ions varie et cela a une influence directe sur leur densité de charge, qui est connue pour affecter la stabilisation/déstabilisation des macromolécules en solution à travers les couches d'hydratation (242). Dans notre étude, l'ion lithium est le plus petit et donc celui avec la plus forte densité de charge, l'ion potassium ayant la plus faible.

Dans les deux cas, il est possible que pour les faibles concentrations en sels, l'écrantage des répulsions électrostatiques conduise à la formation de complexes entre les protéines et les polysaccharides. Ceci expliquerait l'augmentation de la turbidité pour 50mM de sel (147). Au-delà de cette concentration, le processus de stabilisation des polymères induit une diminution de la séparation de phase et par conséquent la diminution de la turbidité. Cacace & al. ont d'ailleurs suggéré que les effets des sels dans la série de Hofmeister n'avaient lieu que pour

des concentrations en sels moyennes à hautes (239). Cela est en accord avec les observations faites dans ce chapitre.

C. Conclusions du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons pu voir que la présence de turbidité au sein de la phase aqueuse était bien due à une séparation de phase ayant pour origine la présence simultanée du PGA et de l'HSA. Il a d'ailleurs été observé que cette turbidité augmentait avec la concentration en polymères.

Le fait d'ajouter du NaCl dans la phase aqueuse permet effectivement, au-delà d'une certaine concentration de diminuer la séparation de phase. Cette diminution de la séparation de phase permet également la fabrication de microparticules pour de très faibles concentrations en polymères, en-dessous de la limite de concentration identifiée par Imane Hedef (1). De plus, l'ajout de sel dans la phase aqueuse en modifie la viscosité.

Du point de vue des caractéristiques des microparticules, plusieurs cas sont à considérer. D'un côté, pour les faibles concentrations en polymères l'ajout de NaCl permet l'obtention de microparticules avec des structures internes différentes en fonction de la concentration en NaCl, allant d'une structure vésiculaire à une structure complètement dentelée. Cette caractéristique est intéressante puisqu'elle permet de moduler la structure des particules que l'on obtient. De plus, toujours dans le cas des faibles concentrations en polymères, les particules obtenues sont capables d'encapsuler un traceur modèle et de le libérer en plusieurs heures dans le milieu, au même titre que les particules classiques, sans ajout de NaCl. D'un autre côté, pour les particules que l'on peut obtenir sans l'ajout de NaCl, le fait d'ajouter le sel ne change rien aux particules obtenues, ni en termes d'aspect, ni en termes de structure interne.

L'ajout d'autres sels a permis d'étudier l'influence de la nature du sel sur la séparation de phase et sur les particules obtenues. Tous les sels testés ont permis l'obtention de particules mais avec des proportions différentes. Les effets respectifs de ces sels ont pu être reliés avec la série de Hofmeister et leur effet sur la séparation de phase corrélée avec leur caractère kosmotrope ou chaotrope.

Pour aller plus loin dans cette étude il serait intéressant d'observer le rendement de fabrication des particules dans les conditions de faibles concentrations en polymères mais également en fonction de la nature du sel utilisé. Cela permettrait peut-être d'optimiser le protocole par rapport au protocole standard dans le but d'utiliser toujours moins de matière première. Enfin, des sels de natures différentes partageant cette fois-ci le même cation mais un anion différent, peuvent être utilisés pour explorer davantage l'effet des sels de la série de Hofmeister.

Chapitre 3 : Phase hydrophobe et optimisation

A. Introduction

Lors de la fabrication des microparticules une étape d'émulsification est nécessaire de manière à disperser la phase aqueuse en gouttelettes dans la phase organique. De cette manière, des particules peuvent se former à partir des gouttelettes dispersées. Cependant une émulsion n'est pas un état thermodynamiquement stable et l'utilisation de tensioactifs est alors nécessaire. Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles qui vont venir se placer à l'interface entre la phase aqueuse et la phase organique. Le fait de se mettre à l'interface va permettre aux tensioactifs de faire baisser la tension de surface et ainsi de stabiliser l'émulsion (243).

Les tensioactifs peuvent être de plusieurs natures. Les plus connus des tensioactifs non ioniques sont ceux de la famille des Spans (esters de sorbitan) et des Tweens (ester de sorbitan ethoxylé). Les groupements chimiques composant les tensioactifs sont très variés également. Il convient donc de trouver le tensioactif le plus adapté à chaque système (en termes de tailles, réactivité, coût ...). Dans notre cas, seuls des tensioactifs de la famille de Span et des Tween ont été utilisés pour l'étude.

Un tensioactif est également caractérisé par sa valeur de Balance Hydrophile-Lipophile (HLB) qui traduit sa propension à être plus ou moins hydrophobe. Un tensioactif avec une valeur de HLB faible (inférieure à 10) sera plus enclin à former des émulsions inverses (eau dans huile) tandis qu'un tensioactif avec une haute valeur de HLB (supérieure à 10) sera plus enclin à former des émulsions directes (huile dans eau) (244). Il est possible de mélanger deux tensioactifs de manière à obtenir une valeur de HLB de mélange, comprise entre les deux valeurs respectives des deux tensioactifs et suivant leurs proportions. La formule pour la valeur de HLB résultante est la suivante :

$$HLB_m = HLB_1 \cdot x + HLB_2 \cdot (1 - x) \quad (33)$$

avec HLB_m la valeur de HLB du mélange résultant, HLB_1 la valeur de HLB du premier tensioactif, HLB_2 la valeur de HLB du deuxième tensioactif et x le pourcentage massique du premier tensioactif.

Dans le cadre de cette étude, seules des émulsions inverses ont été fabriquées et nous nous sommes alors posés la question de savoir quel était le tensioactif ou mélange de tensioactifs le plus adapté à notre système. Dans le protocole standard, le tensioactif utilisé est le Span 85 (trioléate de sorbitan), qui a une valeur de HLB de 1,8. Nous avons alors dans un premier temps cherché à trouver la valeur de HLB critique de la phase organique utilisée lors de la fabrication des microparticules, le myristate d'isopropyle. La valeur de HLB critique d'une phase est la valeur pour laquelle l'émulsion fabriquée sera la plus stable, en quantité la plus importante et qui demandera le moins de tensioactifs. Pour notre système, cette valeur de HLB critique est connue pour les émulsions dans le sens huile dans eau mais pas dans le sens inverse. Il a alors fallu la déterminer expérimentalement. Ce travail a été réalisé avec les différents stagiaires Erasmus dans le laboratoire. La méthodologie est décrite dans la partie Matériel et Méthodes.

B. Matériels et méthodes

1. Matières premières

Les matières premières sont les mêmes que celles présentées dans le chapitre précédent. S'ajoutent à celles-ci :

- Le Span 20, acheté auprès de la société Seppic,
- L'huile de paraffine légère, achetée auprès de la société Fagron

2. Préparation des solutions

Les phases aqueuses sont préparées suivant le même protocole que celui présenté dans le chapitre 2 page 109.

Les phases organiques (myristate d'isopropyle ou huile de paraffine) sont préparées en y ajoutant le ou les tensioactifs. Dans le cas où plusieurs tensioactifs sont utilisés de manière à

cibler une valeur spécifique de HLB, l'équation 33 est utilisée de manière à calculer quelle quantité de chaque tensioactif utiliser.

3. Détermination de la HLB critique

Des émulsions d'eau stérile ou de solution d'HSA sont réalisées dans la phase organique choisie (myristate d'isopropyle ou huile de paraffine) contenant le ou les tensioactifs à hauteur de 7% m/m. La phase aqueuse (10ml) est versée dans la phase organique (20ml) sous agitation à l'aide d'une pale en forme d'ancre dans un tube en verre. Une fois l'émulsion prête, 10ml sont prélevés et versés dans un tube à centrifugeuse. L'émulsion est centrifugée de manière à accélérer le processus de déstabilisation. La hauteur de l'émulsion restante dans le tube après centrifugation est relevée (en cm) et comparée pour les différentes valeurs de HLB.

C. Résultats et discussion

1. Relation entre HLB et microparticules

Le but ici est de déterminer quel impact la nature du ou des tensioactifs utilisés pour stabiliser le système peut avoir sur les microparticules obtenues. Pour cela, plusieurs tensioactifs de la famille des Spans ont été utilisés : le Span 85, le Span 80 et le Span 20. Ces trois tensioactifs ont des structures et des valeurs de HLB différentes (245,246):

- Span 85 : trioléate de sorbitan, HLB = 1.8
- Span 80 : monooléate de sorbitan, HLB = 4.3
- Span 20 : monolaurate de sorbitan, HLB = 8.6

Ces tensioactifs ont été choisis pour leur bonne miscibilité dans les phases organiques de l'étude. Des tensioactifs de la famille des Tweens (esters de sorbitan ethoxylés) ont également été testés mais n'étaient pas adaptés à notre étude. En effet, ils causaient une agrégation des microparticules et induisaient une forme mal définie.

Dans un premier temps, plusieurs lots de particules ont été fabriqués en suivant le protocole standard (sans sel) mais en modifiant la composition de la phase organique et par conséquent la HLB de celle-ci. Les valeurs de HLB allaient de 1.8 (Span 85 seul) à 8.6 (Span 20 seul) et les valeurs intermédiaires étaient atteintes avec des mélanges de tensioactifs. Les particules

obtenues sont présentées dans la Figure 52. Leurs tailles moyennes ainsi que l'indice de polydispersité (PI) de la population de particules sont présentés dans la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

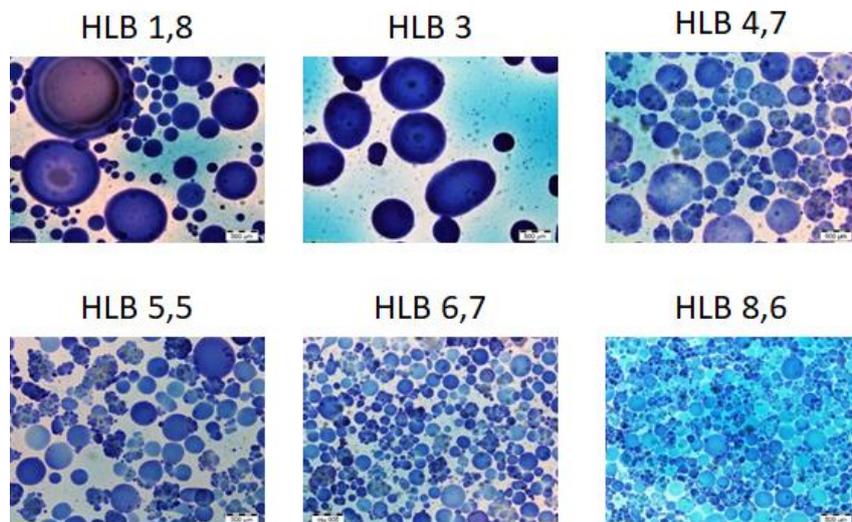


Figure 52 : Particules obtenues pour différentes valeurs de HLB.

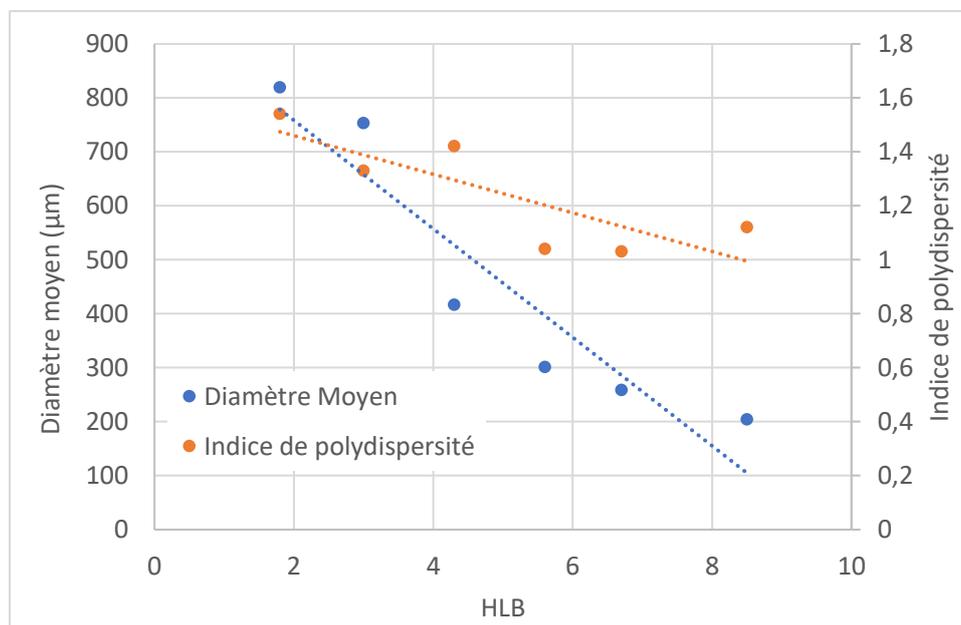


Figure 53 : Diamètres moyens et indices de polydispersité pour les particules obtenues avec différentes valeurs de HLB.

Il est alors clair que la valeur de HLB a une influence directe sur les particules obtenues. La tendance observée montre que plus la valeur de HLB est haute, plus les particules sont petites.

La tension de surface entre les deux phases de l'émulsion diminue à mesure que la HLB augmente, ce qui entraîne une meilleure stabilisation de l'interface et donc des particules plus fines (247). Cependant, la taille moyenne n'est pas suffisante pour décrire une population de particules et l'introduction de l'indice de polydispersité est nécessaire. Celui-ci traduit la largeur de la population de particules. Plus celui-ci sera important, plus la population de particules s'étalera sur une plage de taille importante. Il est donc important pour le formulateur de chercher à diminuer au maximum le PI. Le PI est calculé de la manière suivante (248) :

$$PI = \frac{D(0.9) - D(0.1)}{D(0.5)} \quad (34)$$

On peut voir sur la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** que l'augmentation de la valeur de HLB entraîne une diminution de la valeur du PI jusqu'à une valeur de HLB d'environ 5,5. Au-delà de cette valeur, le PI reste relativement constant. Il semble donc que dans le système étudié, la nature du tensioactif utilisé pour stabiliser l'émulsion ait son importance. En effet, on observe une diminution et surtout une stabilisation du PI en fonction de la quantité de Span présente dans le milieu. Le Span 20, en comparaison au Span 85 est plus petit et moins encombrant (ne possède qu'une seule chaîne grasse, contre 3 dans le cas du Span 85). Il est donc possible que le Span 20 soit plus à même de se déplacer et de se fixer à l'interface et donc de stabiliser l'interface (249).

2. Relation entre la nature des tensioactifs et la morphologie des microparticules

On a montré dans le paragraphe précédent que la valeur de HLB de la phase organique avait une influence sur les particules obtenues. Il est alors naturel de se demander si, pour une même valeur de HLB, le fait d'utiliser des mélanges de tensioactifs différents pouvait avoir une influence sur les particules. Nous avons alors fabriqué des particules pour des valeurs de HLB identiques mais atteintes avec des mélanges de tensioactifs différents. Les résultats sont présentés dans la Figure 54.

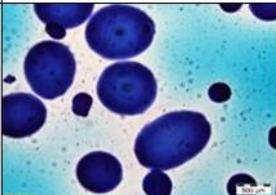
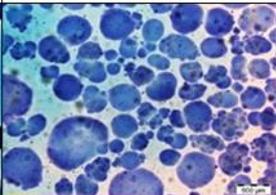
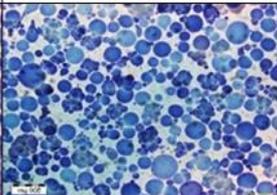
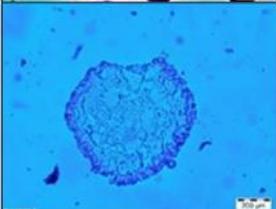
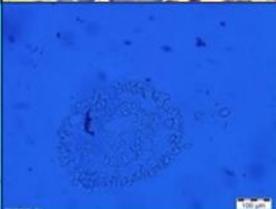
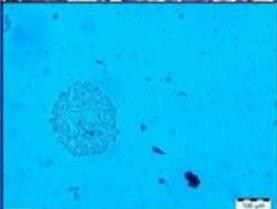
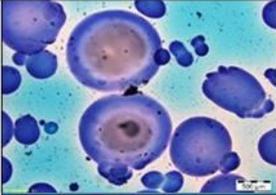
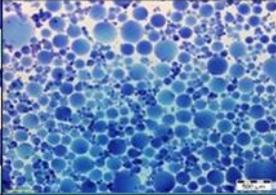
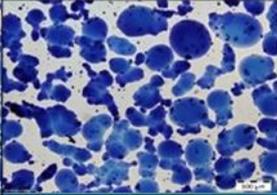
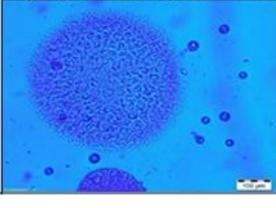
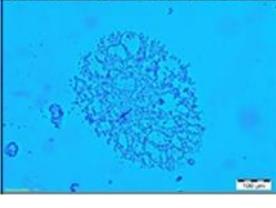
HLB	3	4,7	6,7
Composition	Span 85 / Span 20	Span 85 / Span 20	Span 85 / Span 20
Size (µm)	756,4	421,0	258,4
			
			
Composition	Span 85 / Span 80	Span 80 / Span 20	Span 80 / Span 20
Size (µm)	667,6	349,1	444,5
			
			

Figure 54 : Particules et coupes de particules pour différentes valeurs de HLB et différents couples de tensioactifs.

Chacun des trois tensioactifs utilisés a une structure différente et par conséquent des propriétés potentiellement différentes. Une des différences principales est leur hydrophobie. Cette hydrophobie leur est donnée par la longueur mais aussi la taille de leur queue hydrophobe. Le Span 85 ayant trois chaînes hydrophobes est donc le tensioactif le plus hydrophobe des trois. Les deux autres tensioactifs voient leur queue hydrophobe modifiée par le nombre de carbones qui la composent : 12 pour le Span 20 et 18 pour le Span 80. Le Span 80 possède également une insaturation. Tous ces éléments font que ces trois tensioactifs vont avoir un comportement potentiellement différent à l'interface (en termes de placement notamment) et donc impacter les particules. On peut imaginer que le Span 85, avec ses trois chaînes grasses, prendrait plus de place à l'interface que ses homologues plus petits (249).

La taille et la forme des particules sont influencées par la nature des tensioactifs utilisés. Il apparaît également que la structure interne des particules est affectée.

Dans le cas d'une HLB de 3, les particules obtenues ne semblent pas si différentes en ce qui concerne l'aspect extérieur mais présentent des structures internes non similaires. On observe une structure dentelée dans le cas du couple Span 85/Span 20 tandis que lorsque le couple span85/Span 80 est utilisé, on observe une structure plutôt matricielle très dense.

Pour une HLB de 4 au contraire, les structures internes ne présentent pas de différences majeures mais l'aspect des particules est très différent. Dans le cas du couple Span 85/Span 20, les particules n'ont pas une forme très bien définie et présentent même une légère agrégation. Au contraire, avec le couple Span 80/Span 20, les particules obtenues sont parfaitement sphériques et ne présentent aucune agrégation.

Enfin, pour une valeur de HLB de 6,7, les observations vont dans l'autre sens. Il y a une amélioration de l'aspect des particules lorsque l'on passe du couple Span 80/Span 20 au couple Span 85/Span 20. Les particules ont, avec le premier couple, un aspect non satisfaisant qui ressemble presque à des débris, tandis que l'on obtient des particules bien sphériques avec le second couple. Dans ces conditions, il est aussi intéressant de noter le changement majeur dans la taille moyenne des particules. Celles-ci voient leur taille diminuer de presque la moitié lorsque l'on passe du couple Span 80/Span 20 au couple Span 85/Span 20.

Il semble donc qu'un optimum soit à trouver, aussi bien en termes de valeur de HLB qu'en termes de nature des tensioactifs utilisés.

3. Détermination des valeurs de HLB critique

La valeur de HLB critique est définie comme la valeur de HLB pour laquelle l'émulsion obtenue sera de la meilleure qualité possible (250). Cela implique que la polydispersité de l'émulsion est au minimum, que la quantité de tensioactifs à utiliser pour stabiliser l'interface est minimale et que la stabilité dans le temps de l'émulsion est maximale. Cette valeur est une caractéristique de la phase organique et ne dépend pas du tensioactif ou couple de tensioactifs utilisé. Ces valeurs sont souvent disponibles dans la littérature mais

principalement pour le cas des émulsions directes (eau dans huile) et non l'inverse. Il n'est donc pas rare de devoir déterminer ces valeurs au laboratoire.

3.1. Myristate d'isopropyle

De manière à déterminer la valeur de HLB critique du myristate d'isopropyle pour une émulsion eau dans huile, la quantité minimum nécessaire de tensioactifs est déterminée, c'est-à-dire la quantité de tensioactifs en dessous de laquelle, la stabilité de l'émulsion n'était pas suffisante pour faire les observations. Les concentrations en Span 85 suivantes ont été testées : 1, 5, 6, 7 et 10% m/m.

Une stabilité suffisante est obtenue pour 7% mais nous avons voulu nous assurer qu'il n'était pas possible d'obtenir une meilleure stabilité avec plus de tensioactifs. Les émulsions à 10% en tensioactifs présentent en effet une stabilité légèrement supérieure. Mais dans le contexte de l'économie de matière première, la stabilité des émulsions à 7% était largement suffisante. Dans les cas où l'on a moins de 7% de tensioactifs, les émulsions présentent un déphasage très important et très rapide : déphasage complet pour 1% de tensioactifs en quelques minutes et en quelques heures pour 6%. Quand on passe à 7%, la stabilité est de plus de 24 heures. La suite des manipulations se fait donc pour une concentration de 7% m/m en tensioactifs.

Les valeurs de HLB adaptées pour des émulsions eau dans huile étant inférieures à 10, la gamme de HLB 1.8 – 8.6 a été étudiée. Les émulsions, une fois réalisées, ont été centrifugées de manière à accélérer le vieillissement. Après ce premier balayage, les valeurs de HLB pour lesquelles les émulsions étaient les plus stables se situaient entre 4 et 5.2 mais la distance entre les points expérimentaux ne permettait pas d'avoir un résultat plus précis. Un second balayage a alors été réalisé avec des points beaucoup plus proches : 4, 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5 et 5.2. Les émulsions résultantes après centrifugation sont présentées dans la Figure 55.

Ces résultats indiquent que la valeur de HLB pour laquelle l'émulsion est la plus stable est 4.6. L'expérience a été réalisée deux fois, avec le même résultat. On peut donc conclure que la HLB critique du myristate d'isopropyle est de 4.6 ± 0.2 (la précision de la mesure étant de l'ordre du millimètre).

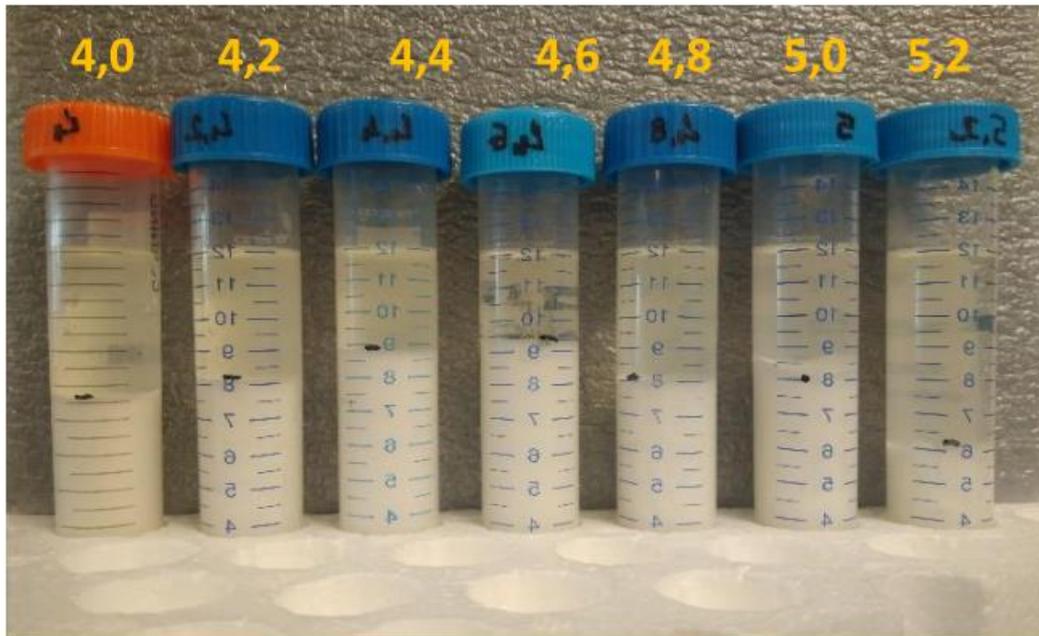


Figure 55 : Etat des émulsions après centrifugation en fonction de la valeur de HLB pour le myristate d'isopropyle.

Ces résultats permettent de mieux comprendre le système, notamment en termes de comportement à l'interface. Cependant, pour aller plus loin nous avons voulu représenter le système encore plus fidèlement. En effet, lors de la fabrication des microparticules, la phase aqueuse ne contient pas uniquement de l'eau, mais également les deux polymères en solution. Ces deux polymères, et principalement l'HSA, possèdent des propriétés tensioactives qui peuvent perturber cette mesure. Comme la HLB critique est une caractéristique intrinsèque de la phase organique et uniquement de celle-ci, la présence d'HSA ne devrait pas changer le résultat fondamentalement. Mais pour nous en assurer de l'HSA a été ajoutée (à hauteur de 1% m/v) dans la phase aqueuse et l'expérience a été renouvelée. Les résultats sont présentés dans la Figure 56.

La présence d'HSA, comme attendu, ne change pas la valeur de HLB critique du myristate. On observe plutôt que la présence d'HSA permet d'élargir la gamme de valeur de HLB critique entre 4,3 et 6.

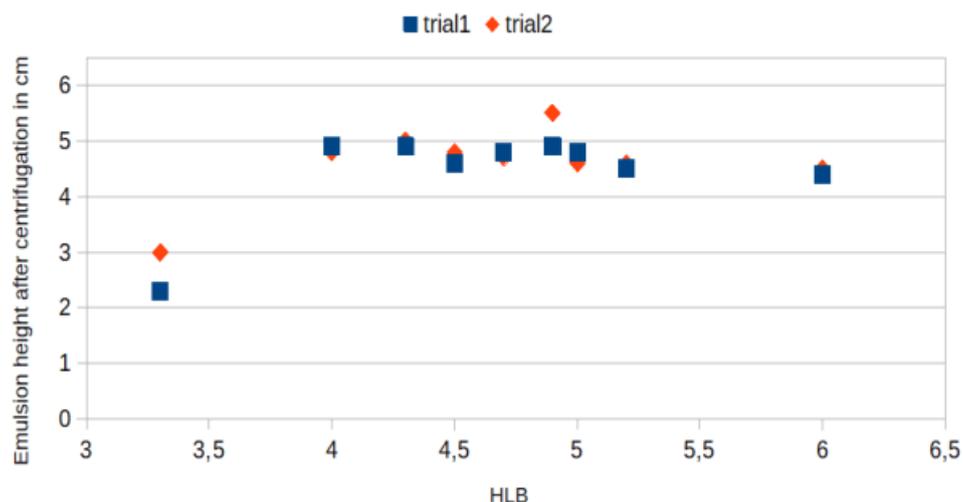


Figure 56 : Hauteur de l'émulsion restante (cm) après centrifugation en fonction de la valeur de HLB pour le myristate d'isopropyle en présence d'HSA.

3.2. Huile de paraffine

Pour l'étude présentée ici, deux phases organiques ont été utilisées : le myristate d'isopropyle et l'huile de paraffine légère. L'intérêt ici est d'avoir deux structures de phase organique de par leur nature chimique et leurs propriétés physico-chimiques. Le choix de l'huile de paraffine n'est pas anodin, sa structure est d'intérêt principal. Contrairement au myristate d'isopropyle, l'huile de paraffine n'a pas de fonction ester dans sa structure (251). Les fonctions esters sont, dans ce protocole, des points de départ pour des réactions parasites de saponification. Ces réactions parasites consomment de la soude, qui ne sera alors plus disponible pour la réaction de transacylation. Ces consommations de soude secondaires peuvent avoir une influence sur le rendement de la réaction de transacylation.

La même méthode que pour le myristate d'isopropyle est utilisée et la valeur de HLB critique est déterminée. Cette fois-ci, l'HSA est présente dès le départ dans la phase aqueuse. Les résultats sont présentés dans la Figure 57. On peut voir que la valeur de HLB critique de l'huile de paraffine se situe entre 4,3 et 6. Contrairement au myristate d'isopropyle, l'huile de paraffine présente une plage de valeur de HLB critique plutôt qu'une valeur unique. Il est intéressant de voir que les deux phases organiques utilisées possèdent donc une gamme de valeurs de HLB critique en commun. Il sera donc possible de comparer ces deux phases organiques pour les mêmes valeurs de HLB.

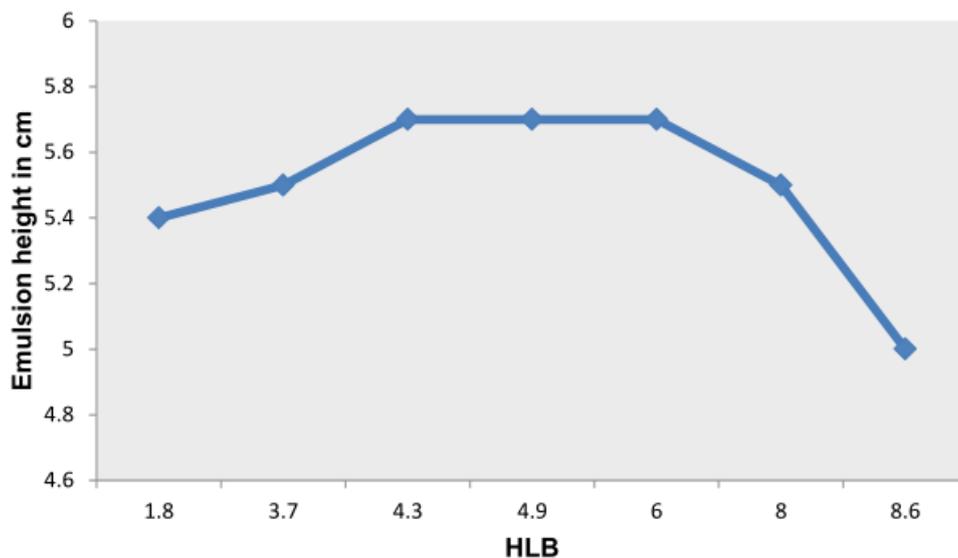


Figure 57 : Hauteur de l'émulsion restante après centrifugation pour l'huile de paraffine.

4. Optimisation

4.1. Rendement

Comme expliqué dans le paragraphe précédent, la présence de fonctions esters sur le myristate d'isopropyle peut entraîner des réactions parasites qui peuvent avoir une influence sur le rendement de réaction de transacylation. Nous avons donc choisi de comparer l'huile de paraffine au myristate pour quantifier l'influence de ce paramètre sur le rendement.

Avant de lancer les expérimentations, une réflexion sur les quantités de matières présentes dans le système a été menée, le but étant de voir si la présence de ces fonctions esters pouvait avoir un réel impact.

Le protocole standard utilise les paramètres suivants :

- 6 ml de phase aqueuse à 10% en HSA et 3% en PGA (DE = 84%),
- 40 ml de phase organique à 5% en Span 85,
- 4 ml d'éthanol 95% à 2% m/v en NaOH,

On obtient les valeurs suivantes :

Tableau 4 : Quantité de matière d'ester pour chaque composé. Quantité de matière de réactif ajouté. Le détail des calculs peut être trouvé en annexes.

Composé	Quantité d'ester (mol)
PGA	$9,83 \times 10^{-4}$
Span 85	$6,27 \times 10^{-3}$
Myristate d'isopropyle	0,126
SOMME	0,133

On remarque alors que le nombre de moles d'esters global (0,133) est très supérieur au nombre de moles de soude ($1,5 \times 10^{-3}$). Cela implique que la réaction de transacylation doit être plus rapide que les réactions de saponification parasites. Néanmoins la quantité de fonctions esters apportées par le myristate d'isopropyle étant loin d'être négligeable, changer de phase organique pour l'huile de paraffine peut présenter un avantage. Les deux phases organiques ont alors été comparées en termes de rendement de réaction. Le même protocole standard de fabrication est utilisé dans les deux cas. Les particules obtenues sont lyophilisées et la masse de matière sèche obtenue est ensuite pesée et exprimée en pourcentage de rendement.

Dans le cas du myristate d'isopropyle, le rendement obtenu est de 57.7%, contre 44.9% dans le cas de l'huile de paraffine. Ce résultat est inverse de ce qui était attendu.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cela. Dans un premier temps il est possible que la réaction de transacylation soit tellement favorisée par rapport aux réactions parasites, que la présence des fonctions esters de la phase organique n'a pas d'influence. Dans un second temps, une question de disponibilité du réactif entre en jeu. Les propriétés du myristate d'isopropyle et de l'huile de paraffine ne sont pas les mêmes. Or le réactif (NaOH) doit passer de la solution d'éthanol à travers la phase organique pour enfin atteindre les gouttelettes de phase aqueuse. L'éthanol et le myristate d'isopropyle sont miscibles, ce qui

n'est pas le cas de l'huile de paraffine. Il est donc évident que le myristate d'isopropyle permet une meilleure circulation de la soude.

Pour pallier ce problème, une quantité plus importante de réactif a été ajoutée dans le système de manière à en améliorer sa disponibilité. Au lieu de 4 ml de soude, 15 ml puis 30 ml ont été ajoutés.

Tableau 5 : Rendements de la réaction de transacylation en fonction de la quantité de soude dans le milieu.

Volume de NaOH	Myristate d'isopropyle	Huile de paraffine
4 ml	57.7%	44.9%
15 ml	67.9%	42.3%
30 ml	73.1%	45.5%

Comme le montrent les résultats, l'augmentation de la quantité de soude entraîne une augmentation du rendement dans le cas du myristate d'isopropyle. En revanche, dans le cas de l'huile de paraffine, aucune tendance ne se dégage et les valeurs de rendement restent dans le même ordre de grandeur. Il semble que le fait d'augmenter la quantité de réactif ne permet pas d'en augmenter la disponibilité. Pour aller plus loin dans le raisonnement, la vitesse d'agitation du système a été augmentée pour l'huile de paraffine (passant de 1500 rpm à 3000rpm) pour avoir un mélange plus homogène et donc tenter de mieux faire circuler le réactif. Le rendement alors obtenu est de 41%, ce qui ne change rien par rapport au protocole classique.

4.2. Couple de tensioactifs

Les valeurs de HLB critique pour les deux phases organiques ont été déterminées dans la partie précédente. On sait alors que pour ces valeurs, les émulsions obtenues seront les plus stables et les plus homogènes possible. Les tensioactifs utilisés pour atteindre cette valeur de HLB critique n'en changeront pas la valeur mais peuvent avoir une influence sur les particules obtenues par leurs structures et propriétés différentes. Il est donc important de déterminer quel est le meilleur couple de tensioactifs dans le cas de la fabrication de microparticules par le protocole développé par le laboratoire. Différentes combinaisons de tensioactifs ont alors

été testées. Les tensioactifs principalement utilisés sont de la famille des Spans mais quelques Tweens ont également été utilisés. Le Tween est ajouté dans la phase aqueuse pour des questions de solubilité.

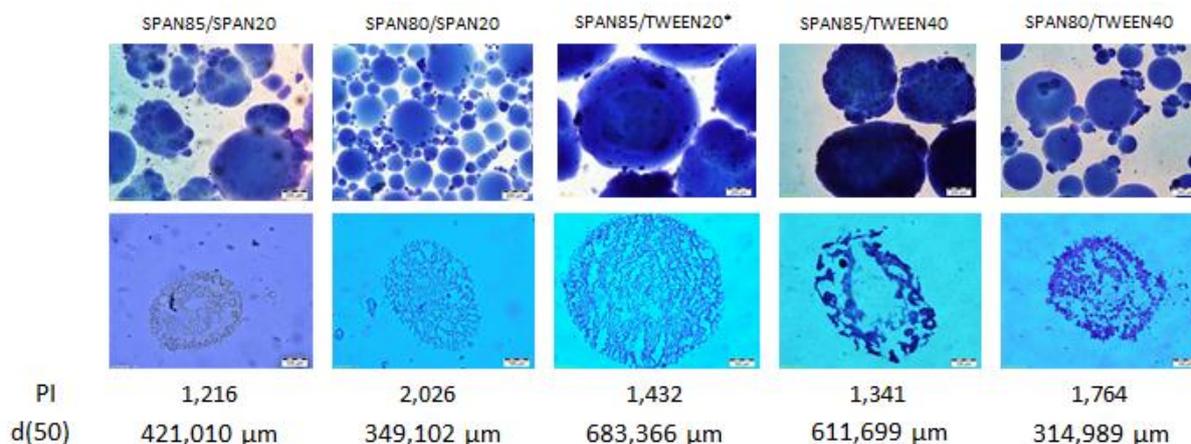


Figure 58 : Particules et coupes de particules pour différents couples de tensioactifs à la même valeur de HLB (4,6).

On remarque alors que dans tous les cas des particules sont obtenues mais leur taille et aspect présentent de nombreuses différences. Dans le cas des Tweens, on remarque la présence systématique d'agrégats et/ou de contours mal définis. On retrouve également cela avec le mélange Span 85 / Span 20. Le meilleur lot de particules observé est celui avec le mélange Span 80/ Span 20, pour lequel les particules sont sphériques, bien définies et sans agrégats. C'est aussi le lot avec l'indice de polydispersité le plus important, ce qui est évidemment un désavantage. Cependant, cela peut être corrigé en ajustant la vitesse d'agitation lors de l'émulsification ou bien la quantité de tensioactifs dans le système.

En termes de structure interne, le couple de tensioactifs ne semble pas vraiment agir sur la manière dont le réseau se forme puisque toutes les structures se ressemblent.

On peut donc conclure que dans le cas du myristate d'isopropyle et pour la valeur de HLB critique 4,6, le couple de tensioactifs Span 80/ Span 20 est le plus adapté car il permet d'obtenir les meilleurs résultats.

4.3. Concentration en tensioactifs

Le meilleur couple de tensioactifs ayant été sélectionné, toujours dans l'optique d'optimisation du process, il est intéressant de savoir quelle est la concentration minimale de tensioactifs qu'il est possible d'utiliser tout en obtenant des particules satisfaisantes. Le couple de tensioactifs identifié comme le meilleur dans le myristate est à nouveau utilisé : Span 80/Span 20 pour une valeur de HLB de 4,6.

Des concentrations croissantes de tensioactifs sont alors utilisées, de 0 à 5% m/m (5% étant la concentration en tensioactifs dans le protocole standard).

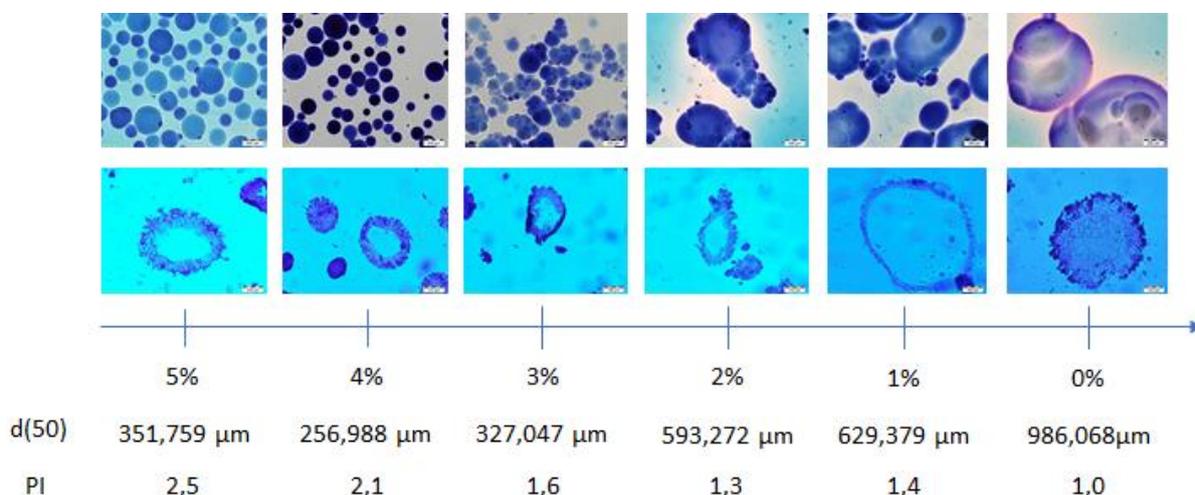


Figure 59 : Particules obtenues pour différentes concentrations en tensioactif. HSA 10% - PGA 3%.

Les particules obtenues pour des concentrations en tensioactifs inférieures à 4% ne sont pas satisfaisantes : les aspects sont irréguliers et les particules sont très agrégées. Il est donc fort possible que la quantité de tensioactifs présente dans le système ne soit pas suffisante pour stabiliser toute l'interface. On remarque également que, jusqu'à 4%, plus il y a de tensioactifs dans le système, plus les particules sont petites. Il y a peu de différences entre 4% et 5% en termes d'aspect des particules. Celles-ci sont bien sphériques et non agrégées. La concentration minimale requise en tensioactifs dans le cas du myristates d'isopropyle est donc de 4%. Lorsque l'on passe à 5% en tensioactifs, on a même tendance à augmenter à nouveau la taille des particules ainsi que le PI. Concernant la structure interne des particules, dès lors que du tensioactif est présent dans le milieu, celle-ci ne change pas et reste de type

vésiculaire. La quantité de tensioactifs présente dans le milieu ne semble pas influencer sur le mode de fabrication du réseau qui constitue les particules.

4.4. Vitesse d'agitation

Dans les paragraphes précédents ont été déterminés les meilleurs tensioactifs ainsi que la meilleure concentration en tensioactifs pour la fabrication des microparticules dans le myristate d'isopropyle. Un dernier paramètre reste à investiguer : la vitesse d'agitation lors de l'émulsification et de la réaction. Pour former une émulsion, il est nécessaire d'apporter une agitation dans le système de manière à disperser la phase aqueuse dans la phase organique. Une valeur minimum d'agitation est donc nécessaire, en-dessous de laquelle la dispersion ne sera pas suffisante et donc non homogène (252).

Des lots de particules sont préparés avec le même protocole et les mêmes phases, avec pour seule différence la vitesse d'agitation. Cette dernière est variée de 1240 rpm à 4000rpm. Ces bornes sont choisies pour des raisons pratiques. En dessous de 1240 rpm, l'émulsion ne se forme pas et cela est observable à l'œil nu. Au-delà de 4000 rpm le système d'agitation subit d'importantes vibrations et chauffe rapidement.

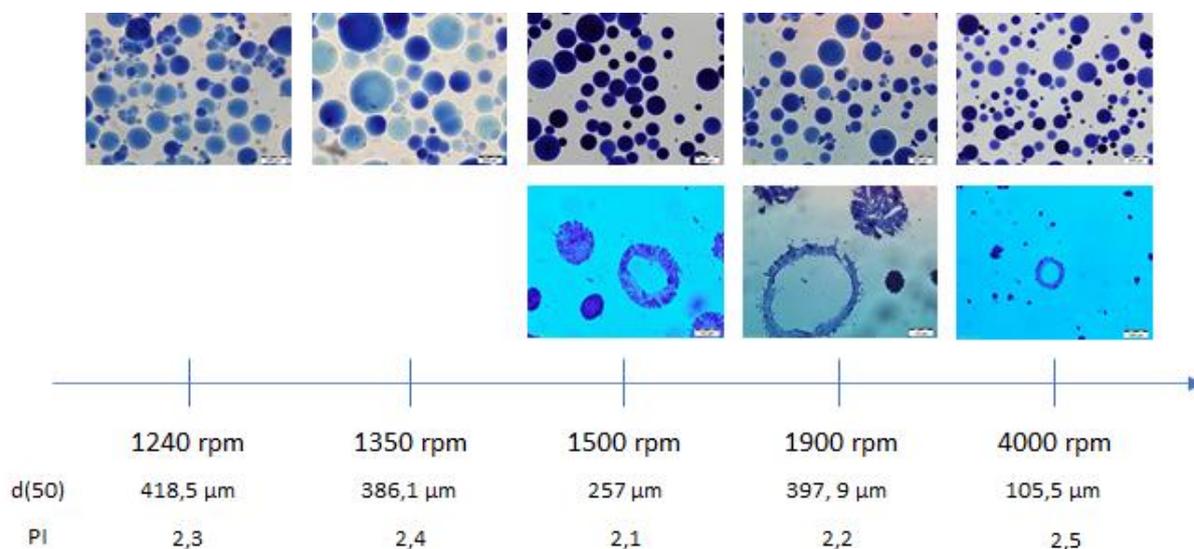


Figure 60 : Particules obtenues en fonction de la vitesse d'agitation. HSA 10% - PGA 3%. HLB 4,6 et 4% de tensioactifs.

On peut remarquer que dans tous les cas, les particules sont sphériques et sans agrégation. Cela n'est pas surprenant puisque les conditions « optimales » déterminées précédemment

ont été utilisés. La vitesse d'agitation ne semble donc pas jouer sur l'aspect et l'agrégation des particules. En revanche, d'autres paramètres sont à prendre en compte pour déterminer l'influence de la vitesse d'agitation. Deux paramètres particulièrement importants sont le diamètre moyen et l'indice de polydispersité. En termes de diamètres moyens, la tendance montre que lorsque la vitesse d'agitation augmente le diamètre moyen diminue. Ce n'est pas surprenant puisque plus l'agitation sera forte, plus la force appliquée sur les gouttelettes d'émulsion sera forte et plus les particules résultantes seront petites.

Pour ce qui est de l'indice de polydispersité (PI), les observations sont différentes. Cet indice traduit l'homogénéité de la population de particules. On peut attendre de cet indicateur qu'il diminue avec la vitesse d'agitation. Or, les observations montrent que ce n'est pas le cas. Le PI ne subit pas de fortes variations, quelle que soit la vitesse d'agitation. Il est donc possible que ce paramètre soit contrôlé par les propriétés interfaciales du milieu, c'est-à-dire les tensioactifs principalement. La dispersion de la population de particules est dépendante de la façon dont les tensioactifs vont stabiliser l'interface.

D. Conclusions du chapitre

Toujours dans l'optique de comprendre et d'expliquer les nombreux phénomènes qui peuvent avoir lieu dans le système étudié, ce chapitre s'est concentré sur l'influence de la nature de la phase organique et de sa composition sur les microparticules obtenues. Plusieurs aspects complémentaires ont été étudiés.

Dans un premier temps, la relation entre la valeur de HLB et les particules obtenues a été explorée. Il en ressort que le choix de la valeur de HLB est d'une grande importance en termes d'influence sur les caractéristiques des particules (taille, dispersion de taille et aspect). Il en découle d'ailleurs que les tensioactifs utilisés ont leur rôle à jouer. Les tensioactifs de la famille des Tweens ne semblent pas adaptés au protocole et cela peut se comprendre car ils sont, de par leur nature, plus adaptés aux émulsions directes. Ainsi, un couple de tensioactifs a pu être sélectionné : le couple Span 80/Span 20. Ce couple de tensioactifs permet a priori d'obtenir les particules qui répondent le plus aux exigences en termes de taille, aspect et dispersion de

taille. En revanche, aucune étude sur le rendement de la réaction dans ces conditions n'a été menée.

Dans la suite, et pour compléter l'étude précédente sur les valeurs de HLB, la recherche des HLB critiques pour les deux phases organiques a été menée. De cette manière, pour le myristate d'isopropyle et pour l'huile de paraffine, les conditions pour obtenir les meilleures émulsions ont été déterminées.

De nombreux questionnements sont apparus quant aux effets de différents facteurs lorsque l'on se place à ces valeurs de HLB critiques, notamment, la concentration en tensioactifs, le couple de tensioactifs, la vitesse d'agitation ... Tout d'abord, et contrairement à nos attentes, le fait d'utiliser l'huile de paraffine à la place du myristate d'isopropyle ne permet pas d'augmenter le rendement de la réaction. En effet, le fait de retirer les fonctions ester du myristate n'a pas vraiment d'influence sur le rendement. C'est pourquoi l'huile de paraffine n'a pas été conservée pour la suite des études de ce chapitre.

Grâce à cette étude, une optimisation du protocole a pu être initiée et des conditions optimales ont pu être définies. Ainsi, la vitesse d'agitation devrait être de 1500rpm avec une concentration en tensioactifs de 4% et le couple Span80/Span 20. De plus, dans le but d'augmenter le rendement, un volume de 30 ml d'éthanol à 2% en NaOH devrait être utilisé. Il s'agit là d'un début d'optimisation qui sera par la suite approfondie grâce aux plans d'expériences.

Chapitre 4 : Plan d'expériences et optimisation

A. Introduction

Le système de microencapsulation étudié est un système complexe faisant intervenir de nombreux paramètres plus ou moins aisés à contrôler. Un des objectifs de cette thèse est de comprendre le fonctionnement et l'influence de ces paramètres de manière à optimiser le protocole pour fabriquer les microparticules les plus satisfaisantes. Dans les chapitres précédents, l'étude portait sur un paramètre précis qui était ensuite optimisé pour voir quelles étaient les bornes de l'étude.

Dans ce chapitre au contraire, une approche multi-paramètres va être utilisée pour tenter, non pas de comprendre la théorie derrière chaque paramètre mais plutôt de comprendre le système dans son intégralité et les interactions qui peuvent avoir lieu entre ces paramètres.

C'est pour cette raison que nous nous sommes tournés vers les plans d'expériences qui, de par leur construction, sont parfaitement adaptés à notre problématique (253–255).

Les plans d'expériences permettent de faire varier de nombreux paramètres simultanément, ici cinq, tout en optimisant le nombre de manipulations pour en faire le minimum possible. De par leur construction ils offrent la possibilité d'avoir accès aux interactions qui peuvent avoir lieu entre ces paramètres. La théorie mathématique pour la mise en place du plan et qui permet d'obtenir une fonction pour simuler le comportement du système est décrite en détail dans l'état de l'art (Chapitre I, partie E, page 91).

Cette partie sera scindée en deux études différentes mais complémentaires, comportant chacune un plan d'expériences différent. Dans un premier temps, un plan factoriel complet sera réalisé et permettra d'identifier, parmi tous les paramètres étudiés, lesquels sont les plus importants. Dans un second temps, un plan d'expériences de Scheffé sera mis en place. Ce

type de plan est également appelé plan d'optimisation et permet d'optimiser la formulation à partir des paramètres identifiés comme importants dans l'étude précédente.

B. Plan factoriel complet 2^5

Dans un premier temps, c'est un plan factoriel complet de 5 facteurs à deux niveaux qui va être présenté. Ce plan a pour objectif d'identifier les paramètres qui ont la plus forte influence sur le protocole de fabrication et sur les particules obtenues. Avant la réalisation du plan, plusieurs étapes de préparation sont nécessaires.

1. Mise en place du plan

1.1. Choix des paramètres

Avant de construire le plan, la première étape est de choisir le nombre de facteurs à faire varier. Ce choix est important car du nombre de facteurs dépend directement le nombre de manipulations selon la formule 2^n , « n » étant le nombre facteurs. Il est donc clair qu'un nombre trop important de facteurs entraîne une quantité de manipulations non raisonnable. Au-delà de 5 facteurs étudiés, il est fortement conseillé d'utiliser un plan fractionnaire.

Grâce à l'expérience du laboratoire avec ce protocole de fabrication et les contraintes manipulatoires que présente le procédé, nous avons pu désigner 5 facteurs que nous avons jugés prioritaires à étudier dans le cadre des plans d'expériences. Le protocole de fabrication de microparticules présenté dans cette étude fait intervenir un nombre bien plus conséquent de paramètres mais tous les étudier serait impossible même avec un plan fractionnaire. C'est pourquoi nous avons fait le choix de n'étudier « que » 5 facteurs avec un plan complet. De cette manière nous avons aussi eu accès aux interactions existantes entre ces 5 facteurs. Nous avons décidé de garder constantes les quantités de polymères (HSA 10% - PGA 3%), et de chercher les conditions d'émulsification optimales pour ces quantités fixées de PGA et d'HSA.

Les 5 facteurs retenus sont les suivants :

- Facteur 1 : la vitesse d'agitation
- Facteur 2 : la nature de la phase organique
- Facteur 3 : le pourcentage de tensioactifs présent dans le milieu

- Facteur 4 : le ratio entre deux tensioactifs (Span 85 et Span 20)
- Facteur 5 : le volume de solution alcoolique de NaOH à 2%.

Chacun de ces facteurs présente un intérêt particulier et peut avoir une influence sur les particules obtenues mais aussi sur le rendement de la réaction. La variation de ces 5 facteurs implique que tous les autres paramètres du système soient conservés strictement constants pour toutes les manipulations.

1.1.1. Facteur 1 : La vitesse d'agitation

Avec notre système d'agitation, la vitesse d'émulsification peut être réglée précisément entre 0 et 6000 rpm. Il est attendu pour ce paramètre qu'il ait une influence importante sur la taille des particules. En effet, dans une émulsion, plus l'agitation est forte plus il est facile de casser des gouttelettes et plus celles-ci seront petites (252). En revanche diminuer la taille des gouttelettes augmente drastiquement l'aire de l'interface au sein de l'émulsion. Ce paramètre peut donc présenter une interaction avec le pourcentage de tensioactifs (facteur 3) mais également la quantité de soude dans le milieu (facteur 5).

Dans le cas de ce plan d'expériences, nous avons choisi de faire varier la vitesse d'agitation entre **1000rpm et 5000 rpm**. Au-delà de 5000 rpm, le système utilisé présente une forte vibration, incompatible avec le montage expérimental présentant un tube en verre. En-dessous de 1000 rpm, l'émulsion ne se forme pas dans le tube.

1.1.2. Facteur 2 : La nature de la phase organique

Les deux phases organiques choisies ici sont **le myristate d'isopropyle et l'huile de paraffine** liquide. Le myristate d'isopropyle est la phase organique qui est utilisée depuis la création de ce protocole et il conduit à des résultats très satisfaisants. Cependant, cette phase hydrophobe présente une fonction ester qui peut se saponifier en présence de NaOH. Cette réaction parasite peut avoir une influence sur le rendement de la réaction de transacylation et c'est pourquoi, une autre huile sans fonction ester a été choisie.

D'autre part, les propriétés de ces deux phases organiques diffèrent, notamment en termes de viscosité, l'huile de paraffine étant plus visqueuse que le myristate d'isopropyle et en termes de lipophilie, l'huile de paraffine étant plus lipophile. Cette différence de viscosité et d'interactions avec les tensioactifs peut avoir une influence sur la taille des gouttelettes et

donc sur la taille des microparticules. Là encore, des interactions avec les facteurs 3 et 5 sont attendues pour les mêmes raisons que précédemment.

1.1.3. Facteur 3 : Le pourcentage de tensioactifs

Le protocole de fabrication des microparticules faisant appel à une émulsion, il est nécessaire d'utiliser un tensioactif pour stabiliser celle-ci. La quantité de tensioactifs utilisée va avoir un impact direct sur la stabilisation de l'interface et donc potentiellement sur la taille des particules mais également sur la polydispersité des particules (252). Dans le cas de cette étude, la quantité de tensioactifs a été variée de **2% à 8% en masse** dans la phase organique.

Dans une moindre mesure, la présence de fonctions esters sur les tensioactifs de la famille des Span peut potentiellement être source de réactions parasites de type saponification. Là encore, ces réactions parasites peuvent modifier le rendement de la réaction.

1.1.4. Facteur 4 : Le ratio entre les deux tensioactifs

Historiquement, un seul tensioactif était utilisé pour la production de microparticules, le Span 85. Néanmoins, dans le chapitre portant sur l'influence du tensioactif, nous avons pu voir que l'utilisation de différents tensioactifs était possible mais que l'on pouvait également mélanger deux tensioactifs au sein de la même phase organique pour faire varier la valeur de HLB. Nous avons alors choisi d'utiliser deux tensioactifs : le Span 85 (tensioactif très hydrophobe avec une valeur de HLB de 1.8) et le Span 20 (tensioactif moins hydrophobe avec une valeur de HLB de 8.6). La variation du ratio de ces deux tensioactifs va donc faire changer la valeur de HLB du milieu et cela peut faire varier les paramètres des particules comme il a été montré précédemment. Ici la variation s'est faite entre **100% de Span 85 et 50%/50% Span 85/Span20**.

1.1.5. Facteur 5 : Le volume de solution alcoolique de NaOH à 2%

La variation du volume de solution alcoolique à 2% en NaOH permet en fait de varier la quantité de NaOH présente dans le système. Comme la soude est l'initiateur de la réaction de transacylation, sa quantité dans le milieu joue un rôle déterminant. Avec des essais préliminaires, nous avons déterminé que le volume minimum en dessous duquel aucune

particule n'était obtenue était de 3ml. Nous avons ensuite choisi la borne supérieure arbitrairement à 8ml. La variation du volume d'éthanol s'est donc faite entre **3ml et 8ml**.

1.2. Choix des réponses

Le but du plan d'expériences est de déterminer quelle est l'influence des paramètres choisis sur les réponses étudiées. Il est donc important de choisir avec pertinence les réponses que l'on souhaite observer. Celles-ci n'ont pas de nombre minimum ni maximum mais doivent représenter au mieux le système. Les réponses que nous avons choisi d'observer sont :

- La taille des microparticules
- L'indice de polydispersité de tailles de la population de particules
- Le rendement de la réaction

1.2.1. *La taille des microparticules*

Cette réponse peut être influencée par de nombreux facteurs et notamment la vitesse d'agitation ou la nature de la phase organique. Les conditions tensioactives du milieu sont aussi à prendre en compte car suivant le tensioactif et la quantité de tensioactifs utilisés, la quantité d'interface stabilisée peut être différente. La mesure des tailles se fait au granulomètre et est **mesurée en μm** .

1.2.2. *L'indice de polydispersité*

Dans des conditions fixes de viscosités pour les 2 phases, l'indice de polydispersité ou PI est en lien étroit avec les propriétés tensioactives du milieu. Plus ces conditions seront optimisées, plus le PI sera petit et la population de particules homogène en tailles. Cette valeur est obtenue grâce au granulomètre et **n'a pas d'unité**.

1.2.3. *Le rendement de la réaction*

Cette réponse est mesurée de manière indirecte en évaluant le volume du culot de particules obtenues après réaction. Cette mesure se fait après l'ajout du tampon imidazole. D'un point de vue pratique, une marque est tracée sur le tube à hauteur du culot et lorsque les lavages sont terminés et le tube vidé, le volume correspondant à la marque est mesuré. Cette réponse est donc **exprimée en ml**.

1.2.4. Construction du plan 2^5

La description du plan complet avec sa matrice complétée est présentée dans la Figure 61.

La colonne « Facteurs » indique les valeurs que vont prendre les facteurs pour chaque manipulation. La colonne « Interaction » permet, grâce aux manipulations, d'identifier les interactions possibles entre les facteurs à différents degrés. Enfin, les réponses mesurées sont indiquées dans les dernières colonnes.

Pour chaque facteur est également indiqué à quoi correspondent les niveaux hauts (+1) et bas (-1) en termes de valeurs expérimentales.

A partir de cette matrice, les effets de chacun des facteurs sur les réponses ainsi que l'importance des interactions peuvent être calculés et implémentés dans le modèle mathématique.

2. Résultats et discussion

L'intérêt principal des plans d'expériences est de pouvoir déterminer les importances relatives des différents facteurs sur les réponses. Pour cela, le plus simple est de présenter les résultats sous la forme de graphique pour que la comparaison puisse être visuelle et évidente. Cependant, devant le nombre conséquent de facteurs et surtout d'interactions entre les facteurs, il est parfois difficile d'extraire les bonnes informations (Figure 64). C'est pourquoi dans un premier temps, nous allons nous intéresser au plan complet pour avoir une vue globale des résultats. Dans un second temps, des demi-plans seront considérés, un pour le myristate d'isopropyle et un pour l'huile de paraffine. Ce facteur (nature de l'huile) étant le seul facteur non continu, il nous paraissait pertinent de faire la scission grâce à celui-ci.

2.1. Plan complet

Les résultats du plan complet sont présentés sous la forme d'histogrammes pour montrer l'importance relative des différents facteurs (Figure 62). Ainsi, chaque réponse aura son histogramme. Plus la barre d'un facteur est importante, plus l'effet de ce facteur sera important. Le côté de la barre par rapport à l'origine est également important car cela traduira quel niveau du facteur (haut ou bas) aura le plus d'effet. Si la barre est du côté des valeurs négatives, cela implique que le niveau bas (-1) aura un poids plus important que le niveau haut. De plus, l'axe des abscisses indique la déviation par rapport à la valeur moyenne de la réponse pour chaque facteur (il faut lire la valeur absolue). On trouve également les clichés de toutes les particules obtenues. Ces clichés sont réalisés au microscope optique après coloration des particules avec une solution de bleu de méthylène (Figure 63).

On peut alors observer que pour toutes les réponses, le facteur « nature de l'huile » est le facteur dominant. Cela implique que la nature de l'huile a un effet non négligeable sur la taille des particules, le rendement de la réaction et la polydispersité de la population de particules. Les deux phases organiques considérées dans cette étude présentent plusieurs distinctions. Premièrement, la viscosité de ces deux phases est très différente donc cela n'est pas surprenant d'observer des différences importantes dans les tailles des particules. Deuxièmement, la nature chimique de ces huiles diverge. Nous avons d'un côté un ester

d'acide gras (myristate d'isopropyle) avec des différences de polarité au sein de la molécule, et de l'autre côté une chaîne carbonée sans fonction particulière. Ces différences de nature chimique entraînent des différences de comportement. La plus notable est la miscibilité de l'éthanol avec ces huiles : l'éthanol est miscible avec le myristate d'isopropyle mais pas avec l'huile de paraffine. Cela implique que la circulation de l'éthanol et donc de la soude ne sera pas la même suivant la phase organique et cela aura une influence certaine sur le rendement de la réaction. Enfin, les différences de structures chimiques peuvent entraîner des différences dans la façon dont les polymères de la phase aqueuse et les tensioactifs interagiront avec la phase organique à l'interface, résultant en une interface plus ou moins stabilisée. Moins l'interface sera stabilisée, plus l'indice de polydispersité sera important.

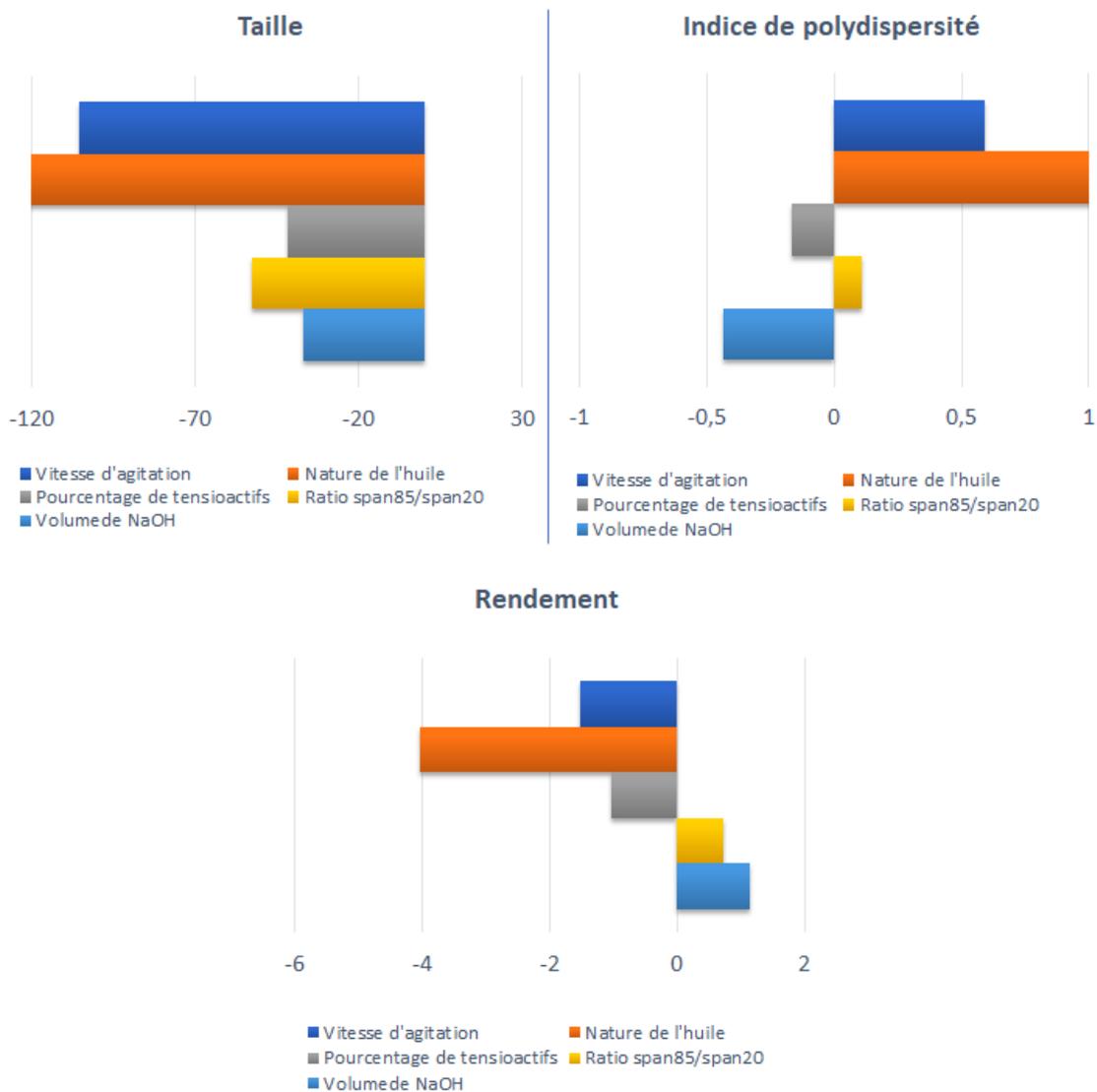


Figure 62 : Effets des facteurs pour chaque réponse dans le cas du plan factoriel complet.

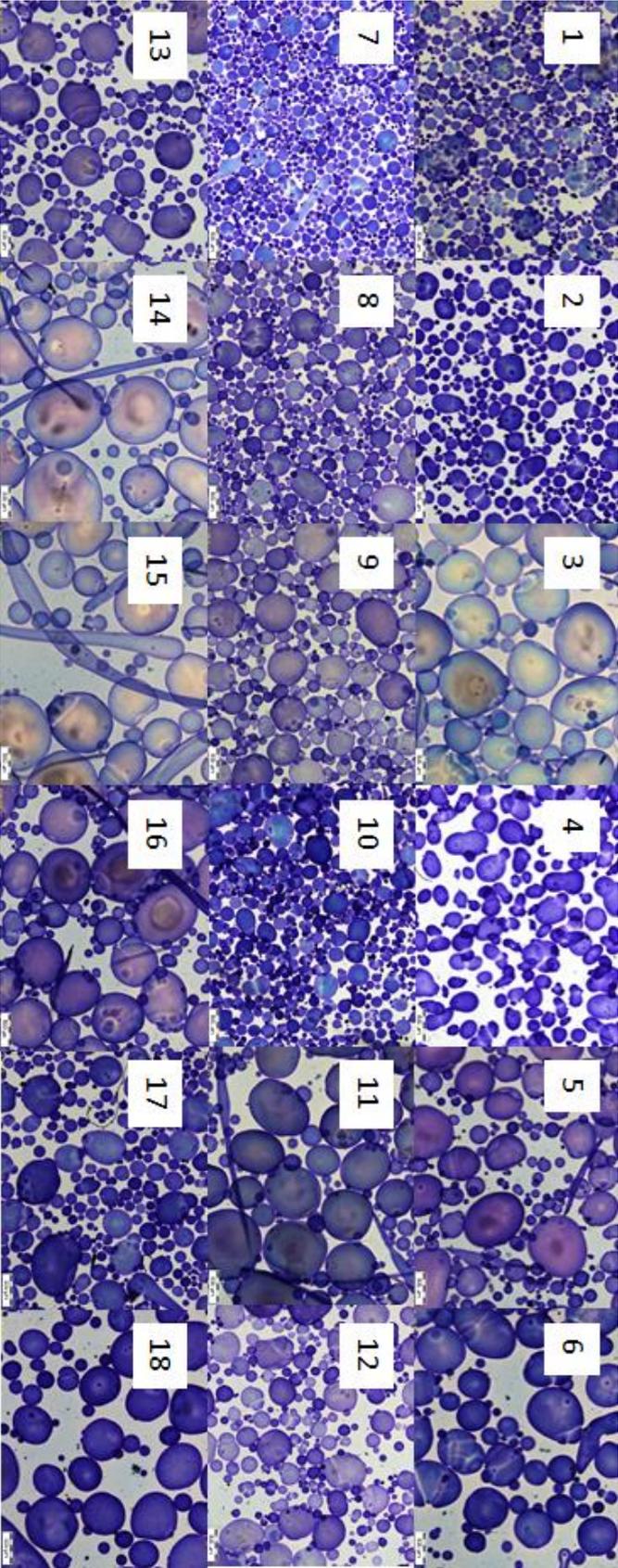


Figure 63 : Clichés des particules obtenues avec le plan d'expériences.

Le second facteur le plus important est la vitesse d'agitation. Ce facteur exerce un effet très important sur la taille et sur la polydispersité des particules, moins sur le rendement. Ce résultat n'est pas surprenant puisqu'il est connu que la vitesse d'agitation est un des paramètres clés dans la modification de la taille des particules. L'effet de ce facteur sur le rendement est moindre mais notable tout de même. La modification de la taille des particules entraîne une modification de la quantité d'interface et il en découle une modification du rendement de la réaction due à la disponibilité de soude par unité d'aire interfaciale.

Les trois autres facteurs ont finalement une influence moindre dans l'obtention des particules, en particulier sur l'indice de polydispersité et le rendement. L'effet sur la taille des particules peut être noté, avec une taille plus importante si l'on utilise uniquement le Span 85 plutôt que le mélange Span 85/Span 20.

Il résulte de ce premier plan d'expériences que parmi les 5 facteurs étudiés, deux peuvent être qualifiés de facteurs influents : la nature de l'huile et la vitesse d'agitation. Les autres facteurs ne semblent avoir finalement qu'un effet limité par rapport aux deux cités précédemment.

Une fois les facteurs influents identifiés, il est intéressant d'étudier les interactions entre ces facteurs. Cependant, si l'on considère tous les facteurs en même temps, il devient difficile d'extraire les bonnes informations à partir d'autant de données simultanément. Les histogrammes résultants de l'étude des interactions deviennent compliqués à lire (Figure 64). C'est pourquoi, dans un souci de lisibilité, nous avons choisi de diviser le plan complet présenté ci-dessus en deux demi-plans de chacun 4 facteurs. La scission du plan complet s'est faite grâce au seul facteur non continu du plan à savoir la nature de l'huile. Comme nous venons de le voir, ce facteur est également le facteur le plus influent. Le fait de couper le plan grâce à ce facteur permet alors d'observer plus en détail l'influence des autres facteurs mais également d'identifier plus facilement les interactions. Il y aura alors un demi-plan pour le myristate d'isopropyle et un demi-plan pour l'huile de paraffine.

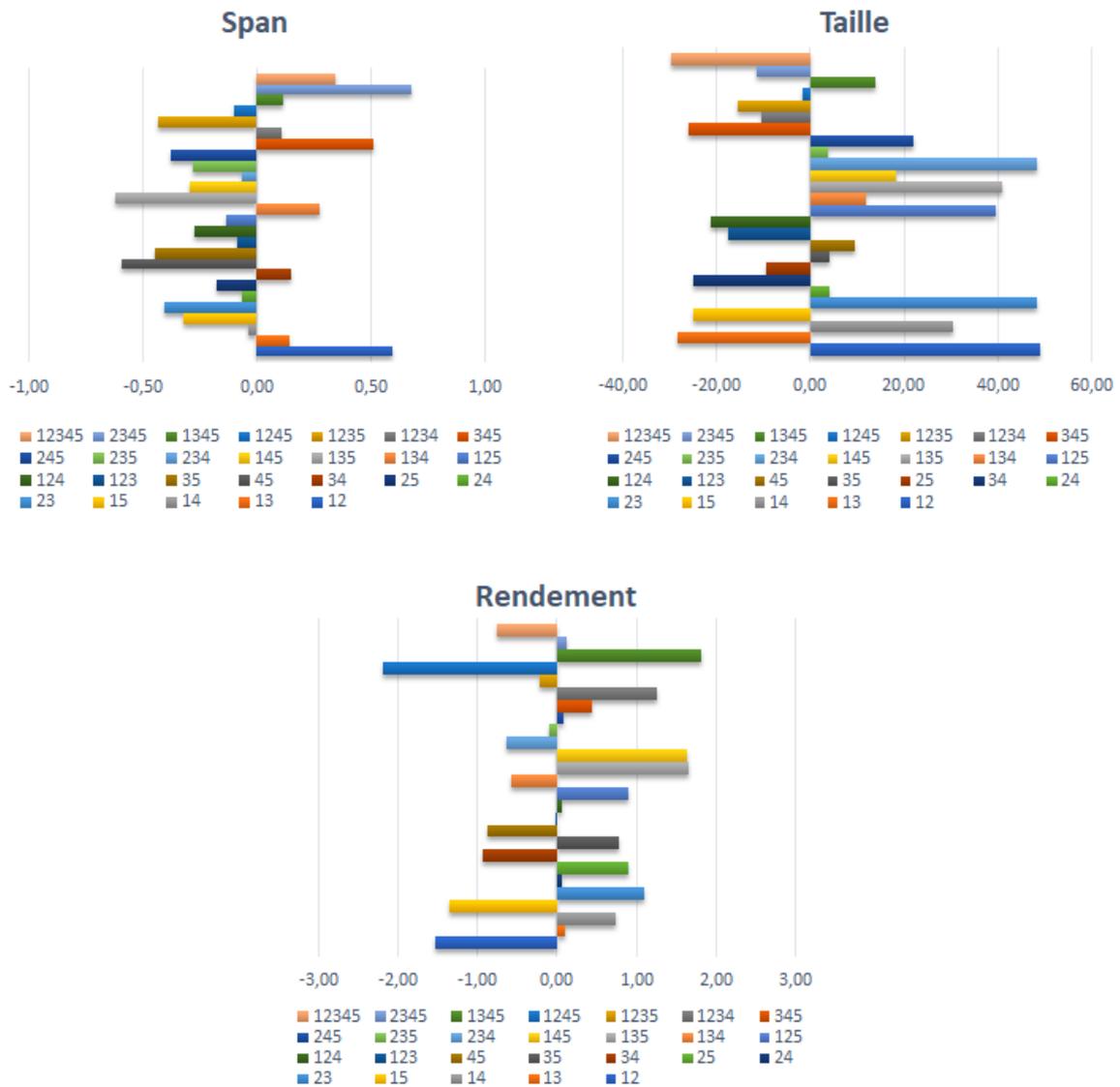


Figure 64 : Interactions entre les facteurs pour le plan complet. "123" signifie l'interaction entre le facteur 1, le facteur 2 et le facteur 3.

2.2. Les demi-plans

Dans cette section, les deux demi-plans seront considérés indépendamment en termes d'effets des facteurs et des interactions. Le fait de retirer l'effet du facteur le plus influent (nature de l'huile) permet de mettre en lumière des informations masquées précédemment.

2.2.1. Demi-plan du myristate d'isopropyle

Il est intéressant de constater que les conclusions faites avec le plan à 5 facteurs, ne se retrouvent pas lorsque l'on considère les demi-plans. Cela pourrait indiquer que l'influence du

facteur « nature de l'huile » était tellement importante qu'elle masquait l'influence des autres facteurs. Les effets des facteurs sous la forme d'histogrammes sont représentés dans la Figure 65.

Premièrement, il est intéressant que noter que le facteur « vitesse d'agitation » perd de son influence sur l'indice de polydispersité et sur le rendement. En revanche son influence sur la taille reste prédominante. La viscosité du myristate d'isopropyle étant faible, il n'est pas nécessaire d'avoir une agitation forte pour homogénéiser facilement la taille des particules, ce qui expliquerait l'absence d'influence de ce facteur sur cette réponse. D'autre part, l'éthanol étant miscible avec le myristate d'isopropyle, la soude peut circuler librement et aucune limitation de diffusion n'est alors observée. Cela explique probablement le fait que la vitesse d'agitation n'ait pas d'influence sur le rendement de la réaction.

En ce qui concerne l'indice de polydispersité, les facteurs restants semblent avoir une influence de la même intensité sur cette réponse. L'augmentation de la quantité de soude fait diminuer l'indice de polydispersité tandis que l'augmentation de la quantité de tensioactifs ainsi que l'augmentation de la quantité de Span 20 font augmenter cet indice. On pourrait s'attendre à ce que le fait d'ajouter plus de tensioactifs permettrait de stabiliser plus efficacement l'interface et donc de diminuer l'indice de polydispersité. Il est donc possible que le tensioactif choisi dans ce système ne soit finalement pas le plus adapté.

Pour finir, les effets des facteurs sur le rendement sont également un peu surprenants. En effet, on peut voir que l'effet de la quantité de solution alcaline ajoutée dans le milieu n'exerce presque aucune influence sur le rendement de la réaction. On pourrait s'attendre à ce que plus de NaOH implique un meilleur rendement, mais cette tendance reste très faible. D'autre part, le fait d'augmenter la quantité de tensioactifs entraîne une diminution du rendement. Il est possible que l'interface soit alors plus saturée en tensioactifs et que la circulation de la soude soit plus complexe vers l'intérieur des gouttelettes ou encore que la saponification des tensioactifs consomme plus de soude.

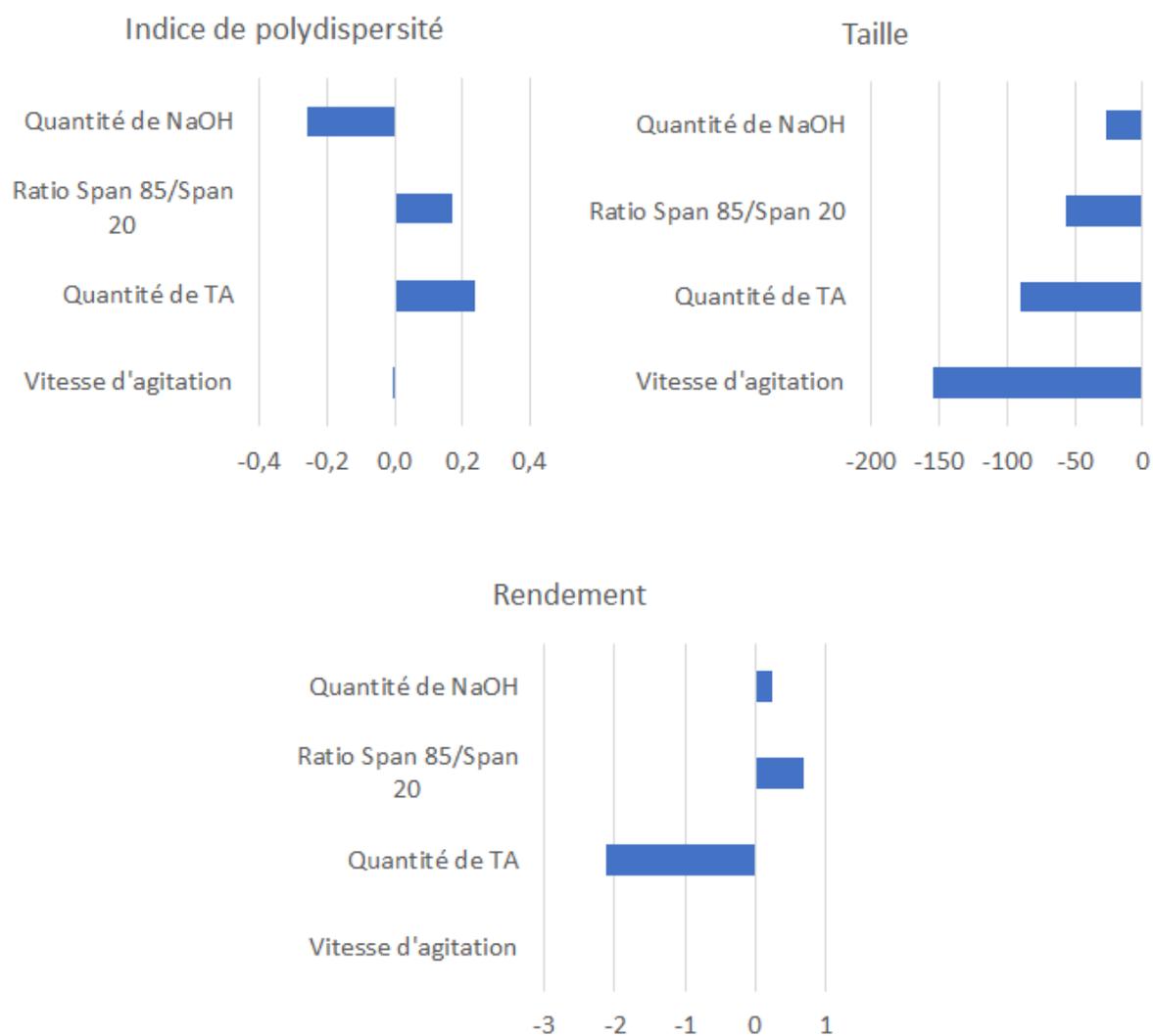


Figure 65 : Effets des facteurs pour le demi-plan du myristate d'isopropyle.

Néanmoins, la manière de mesurer le rendement à ce moment des manipulations s'est avéré plus tard comme étant non pertinent. Dans le cadre de ce plan d'expériences, une mesure du volume du culot de particules était réalisée, mais seulement une fois le tampon imidazole ajouté. Il est alors possible que les particules commencent à gonfler et que le volume du culot ne représente pas le rendement mais plutôt une capacité de gonflement. Les résultats pour le rendement sont donc à prendre avec précaution.

En ce qui concerne les interactions entre les facteurs (Figure 66), on peut voir que dans le cas de l'indice de polydispersité, toutes les interactions sont présentes et similaires en intensité. Cela implique que tous les facteurs interagissent entre eux et qu'aucun n'est vraiment indépendant. Pour les deux autres facteurs, les mêmes conclusions peuvent être observées.

En effet, même si toutes les interactions ne sont pas de la même intensité, des interactions fortes sont présentes entre des facteurs pris deux à deux ou bien entre les 4 simultanément.

Ces observations ne sont pas surprenantes dans le sens où tous ces facteurs ont été choisis comme étant importants par rapport au protocole. De plus, beaucoup d'entre eux ont une influence directe sur l'interface, aussi bien en termes de stabilisation ou de quantité d'interface. Il est donc cohérent que des interactions fortes puissent exister.

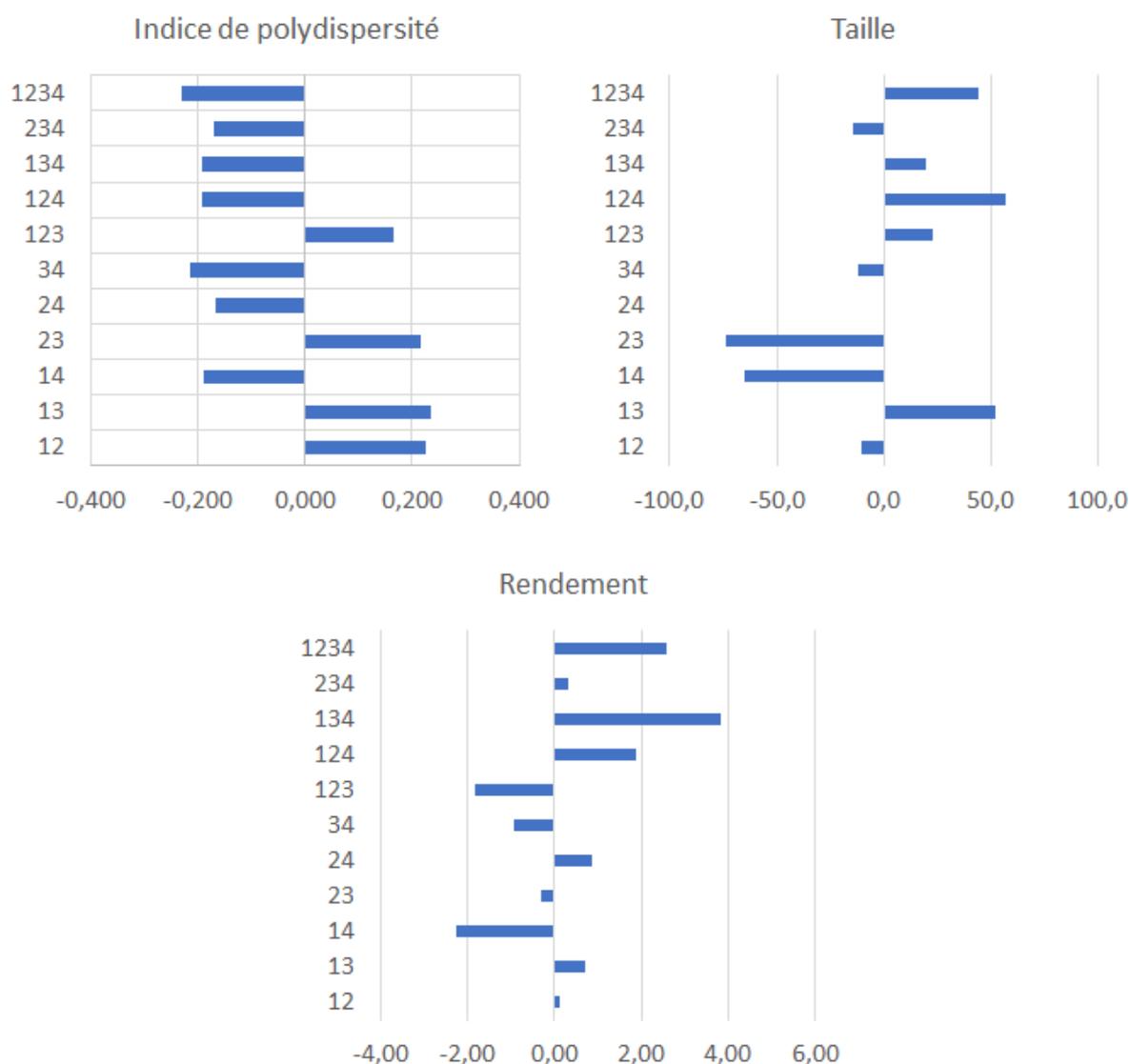


Figure 66 : Interactions entre les facteurs pour le demi-plan du myristate d'isopropyle.

2.2.2. Demi-plan de l'huile de paraffine

La même étude que celle présentée dans le paragraphe précédent est réalisée avec l'huile de paraffine. Les résultats sont présentés dans la Figure 67 et la Figure 68.

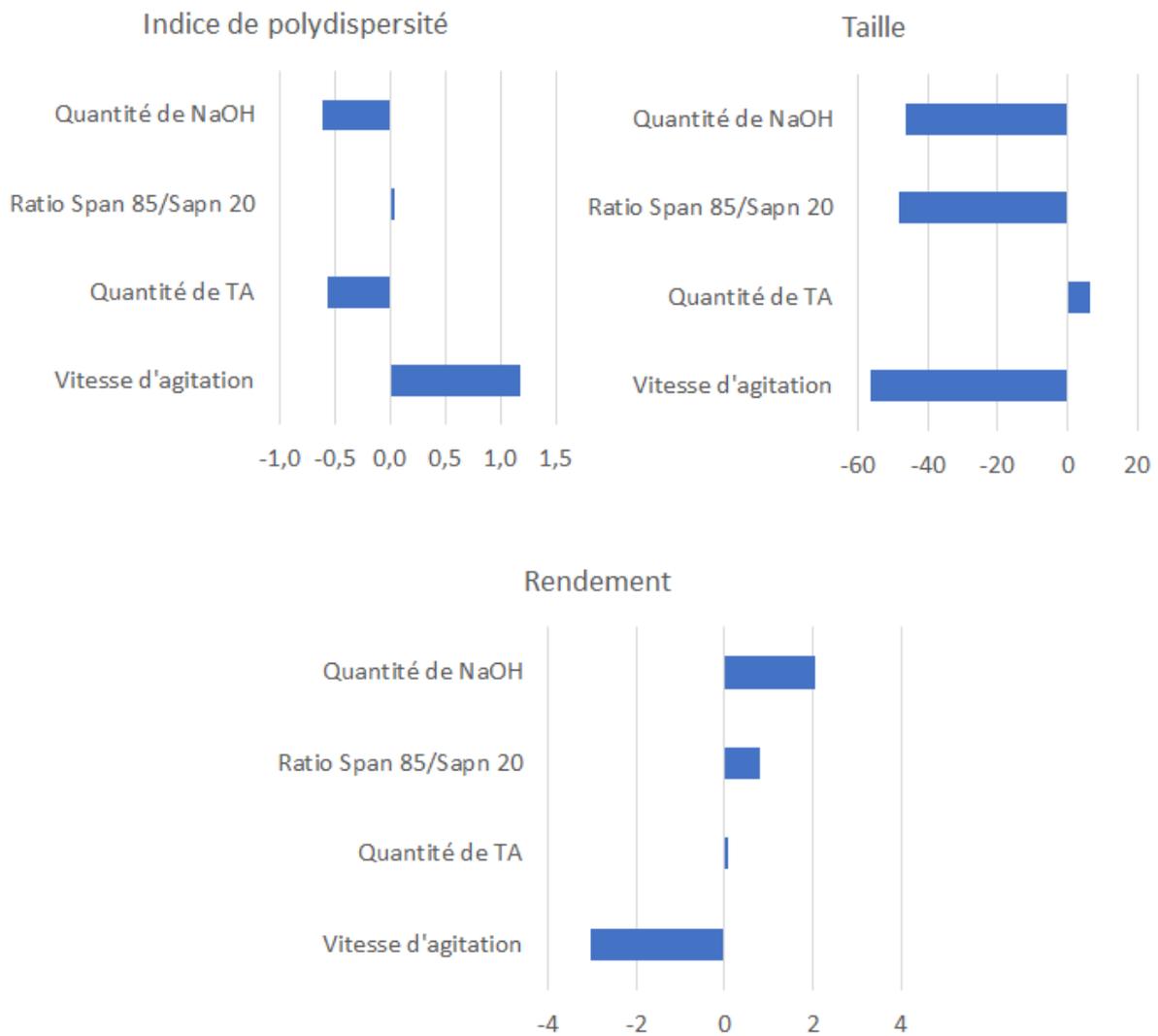


Figure 67 : Effets des facteurs pour le demi-plan de l'huile de paraffine.

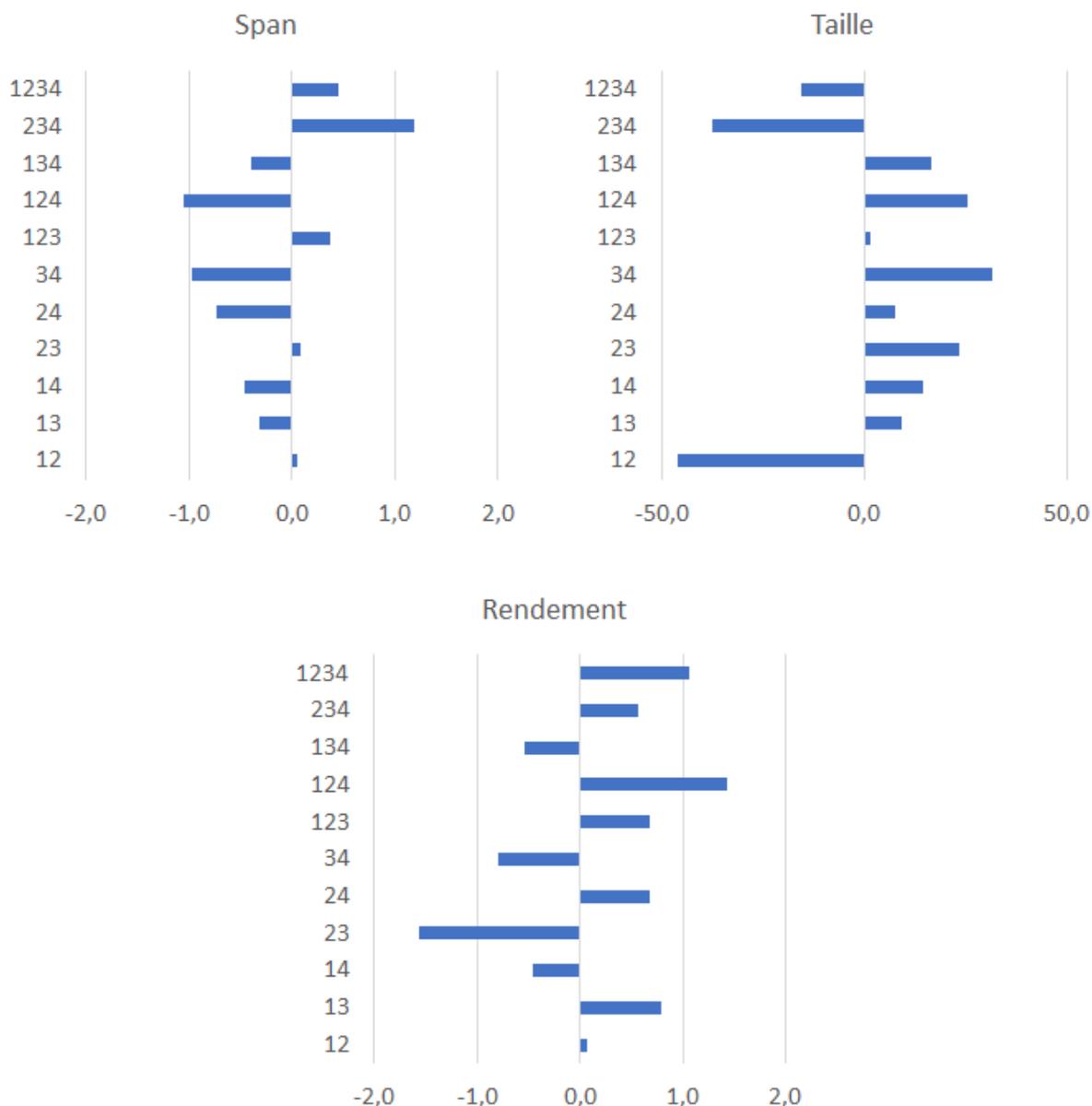


Figure 68 : Interactions entre les facteurs pour le demi-plan de l'huile de paraffine.

En comparaison avec les résultats obtenus pour le myristate d'isopropyle, ceux de la paraffine sont complètement différents. On remarque premièrement que, contrairement au myristate d'isopropyle, dans le cas de l'huile de paraffine, la vitesse d'agitation présente un effet important sur l'indice de polydispersité et sur le rendement. En effet, plus la vitesse d'agitation est importante, plus l'indice de polydispersité augmente. La haute viscosité de l'huile de paraffine rend difficile l'obtention d'une population homogène de particules. Même pour des vitesses importantes, l'agitation ne suffit pas à casser les gouttelettes efficacement. Au contraire, cela va aggraver le phénomène.

En ce qui concerne le rendement, il faut, là aussi, prendre beaucoup de précautions par rapport aux conclusions que l'on peut en tirer puisque la méthode de mesure volumétrique est utilisée. Néanmoins il semble que l'augmentation du volume de solution alcaline permette d'augmenter le rendement en rendant la soude plus accessible dans le milieu.

Pour les effets des facteurs sur la taille des particules, tous sont très importants sauf la quantité de tensioactifs dans le système. Il semblerait donc que l'interface soit stabilisée correctement et que la quantité de tensioactifs minimum soit suffisante.

Comme pour le myristate d'isopropyle, les interactions entre les facteurs dans le cas de l'huile de paraffine montrent que tous les facteurs ont un lien entre eux. Même si toutes les interactions n'ont pas la même intensité, les plus importantes englobent tous les facteurs.

La réalisation de ces deux demi-plans a permis d'apporter des réponses sur le fonctionnement du système mais a également soulevé d'autres questions. Dans un premier temps nous nous sommes rendu compte que l'utilisation de l'huile de paraffine, bien qu'elle permette l'obtention de particules, n'était pas satisfaisante. En effet, les particules que l'on obtient ne sont pas bien définies et ont des tailles trop hétérogènes. La suite de l'étude du système pour optimisation sera donc focalisée sur le myristate d'isopropyle. De ce fait, garder la vitesse d'agitation comme facteur ne semblait pas pertinent du fait de sa faible influence sur les réponses dans le cas du myristate d'isopropyle.

Ensuite, la mesure du rendement par volume du culot de particules n'étant pas satisfaisante, nous avons choisi d'étudier l'influence de certains paramètres sur le rendement avec une mesure par quantité de matière sèche.

C. Plan d'optimisation de Scheffé

Les plans d'expériences de Scheffé sont largement utilisés dans le domaine de la formulation car ils permettent d'étudier 3 facteurs simultanément et de représenter les résultats grâce à des surfaces de réponse (256,257). Cela permet donc d'obtenir un optimum pour la formulation étudiée. De plus, il est possible d'implémenter dans le système des critères de désirabilité pour chaque réponse, accordant plus d'importance à telle ou telle réponse. De ce fait, la modélisation de la réponse peut être pondérée par cette désirabilité.

1. Mise en place du plan d'expériences

La mise en place de ce plan se déroule de la même manière que pour le plan complet présenté précédemment. Les facteurs étudiés sont en partie les mêmes et ceux qui ont été retenus ici sont :

- La quantité de tensioactifs : 2% à 8%
- Le ratio entre le Span 85 et le Span 20 : 100/0 à 50/50
- La quantité de solution alcaline à 2% de NaOH : de 3ml à 15ml

Pour l'étude de ces trois facteurs, 18 manipulations sont nécessaires. Contrairement au plan complet, les facteurs prennent ici plusieurs valeurs (et non seulement deux). De cette manière, le balayage est plus précis et l'effet des facteurs mieux évalué. La matrice remplie avec les valeurs des facteurs et les réponses est présentée dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Matrice pour le plan de Scheffé.

Run	Type	Component 1 A:V_NaOH	Component 2 B:Qté TA	Component 3 C:Span 20	Response 1 PI	Response 2 Taille µm	Response 3 Rendement %
15	Vertex	15.000	2.000	0.000	1.446	761.155	55
11	Vertex	9.000	8.000	0.000	1.494	426.791	47
3	CentEdge	12.000	5.000	0.000	1.546	622.376	75
14	AxialCB	12.000	3.500	1.500	1.526	590.325	62
13	AxialCB	9.000	6.500	1.500	1.567	385.127	62
16	Interior	10.500	5.000	1.500	1.557	472.22	71
6	CentEdge	12.000	2.000	3.000	1.475	702.618	47
10	CentEdge	6.000	8.000	3.000	1.717	190.907	46
5	Interior	10.500	3.500	3.000	1.593	521.263	56
8	Interior	7.500	6.500	3.000	1.759	227.626	53
9	Center	9.000	5.000	3.000	1.604	305.897	64
12	Center	9.000	5.000	3.000	1.723	294.683	53
17	AxialCB	9.000	3.500	4.500	1.578	350.076	61
7	AxialCB	6.000	6.500	4.500	1.608	146.923	68
2	Interior	7.500	5.000	4.500	1.715	202.119	74
18	Vertex	9.000	2.000	6.000	1.351	448.577	65
4	Vertex	3.000	8.000	6.000	1.082	269.539	55
1	CentEdge	6.000	5.000	6.000	1.451	210.363	62

Une petite manipulation mathématique était nécessaire pour la mise en place de ce plan. Comme celui-ci est construit sur la forme d'un triangle équilatéral, certaines proportions doivent être cohérentes pour que la forme géométrique soit pertinente. C'est pour cette raison que la ratio Span85/Span20 est exprimé en valeur numérique allant de 0 à 6 et non en valeurs véritables du ratio. L'équivalence est la suivante :

- 0 : 100 % de Span 85
- 1,5 : 87,5% de Span 85 / 12,5% de Span 20
- 3 : 75% de Span 85 / 25% de Span 20
- 4,5 : 62,5% de Span 85 / 27,5% de Span 20
- 6 : 50% de Span 85 / 50% de Span 20

Les réponses choisies pour ce plan sont les mêmes que celles du plan factoriel complet, à savoir, la taille moyenne des particules, l'indice de polydispersité de la taille des particules et le rendement.

2. Résultats et discussion

2.1. Analyse des effets des facteurs sur les réponses

Les résultats, en plus des valeurs numériques présentés dans le Tableau 6, sont également représentés de manière graphique dans la Figure 69. Les effets de chaque facteur sont représentés dans le domaine d'étude sous la forme de nuances de couleurs pour chaque réponse.

Le résultat le plus parlant et le plus surprenant est celui concernant la taille moyenne des particules. Il est clairement observable qu'il y a une corrélation entre le volume de solution à 2% de NaOH et la taille des particules. Plus il y a d'éthanol, plus les particules sont grosses. Une explication possible viendrait de la capacité de l'éthanol à passer dans la phase aqueuse, ce qui permettrait aux gouttelettes de l'émulsion de gonfler. Il y a le même rapport entre les tailles des particules et entre les volumes extrêmes de solution alcaline (un rapport de 5), ce qui vient renforcer cette hypothèse.

En ce qui concerne l'indice de polydispersité, celui-ci semble augmenter avec la quantité de tensioactifs, ce qui est contre intuitif. Le centre du domaine d'étude devient alors la zone avec

l'indice de polydispersité le plus haut, ce qui est le moins souhaitable pour le système. L'origine de cette observation est difficile à obtenir et à comprendre. Néanmoins il semblerait également que le volume d'éthanol ait un rôle à jouer dans ce résultat.

Concernant le rendement, deux axes sont principalement impliqués. Si l'on considère la quantité de tensioactifs, le rendement augmente à partir de 2% de tensioactif, jusqu'à environ 5% puis diminue à nouveau jusqu'à 8%. Cela voudrait dire qu'un minimum de tensioactifs est nécessaire pour que la réaction se passe dans de bonnes conditions, mais qu'un excès de tensioactifs devient néfaste. Si l'on imagine une interface couverte de tensioactifs dans le cas de l'excès, on peut imaginer que le réactif (NaOH) ne parvient pas à accéder à la gouttelette aussi facilement, ou qu'il est consommé par la saponification du tensioactif en excès.

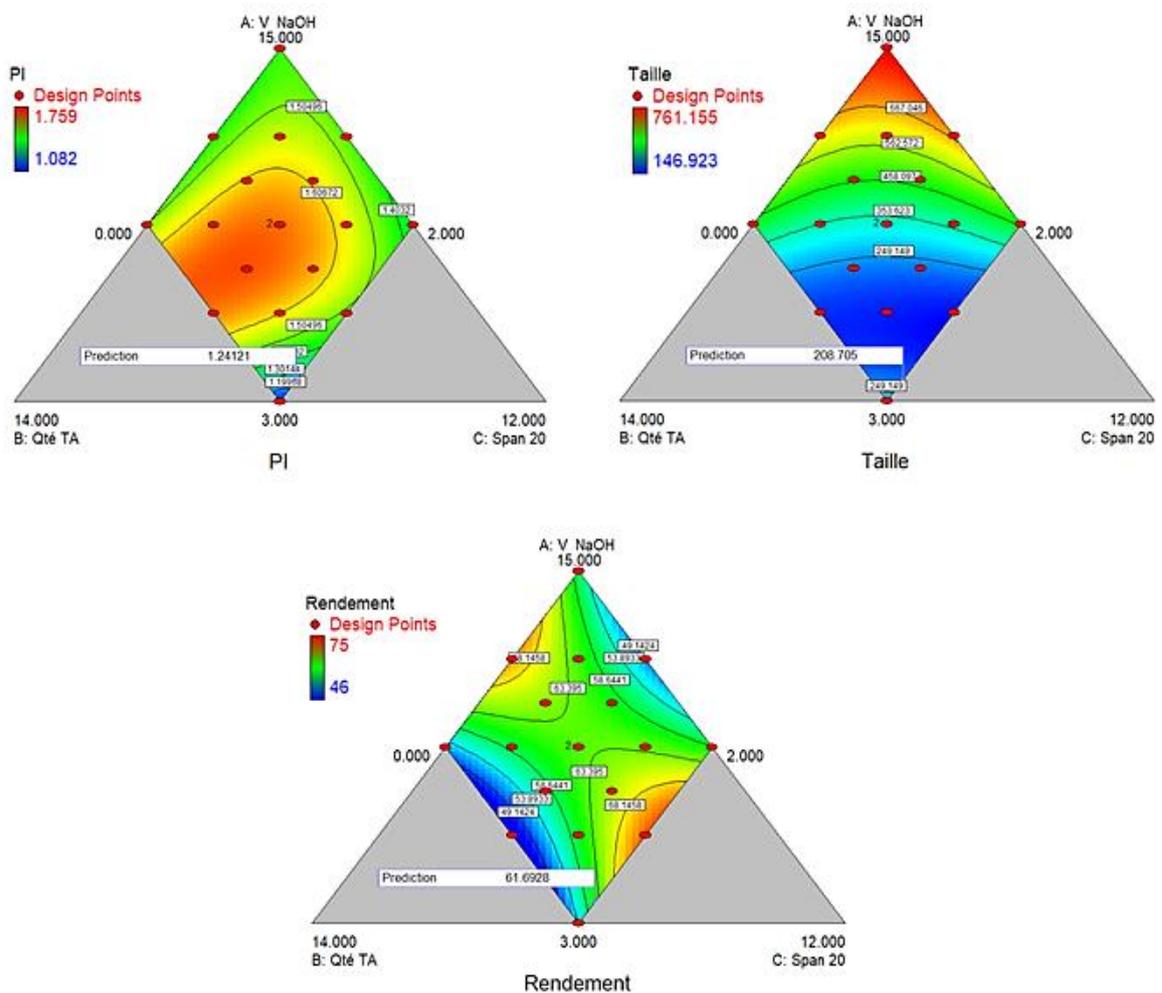


Figure 69 : Résultats sous forme graphique du plan de Scheffé. (Des versions plus grandes pour plus de netteté sont disponibles en annexes).

L'autre axe qui semble important est celui du ratio des deux tensioactifs. Lorsque seul le Span 85 est utilisé, le rendement est correct et diminue au fur et à mesure que l'on ajoute du Span 20 jusqu'à un ratio d'environ 25% de Span 20 dans le système. Au-delà de ce point, le rendement tend à nouveau à augmenter jusqu'au ratio 50/50. Il semble donc qu'il y ait un équilibre à trouver entre ces deux tensioactifs pour finalement atteindre une sorte de synergie. Une trop faible quantité de Span 20 conduit à une déstabilisation de l'interface et potentiellement à un moins bon rendement. Ces deux tensioactifs ont une structure chimique différente, le Span 85 ayant trois chaînes grasses alors que le Span 20 n'en possède qu'une. Cette différence de taille peut potentiellement apporter une souplesse à l'interface si les bonnes proportions sont trouvées, l'un des tensioactifs complétant les espaces libres laissés par l'autre.

Cela correspond à l'étude sur la HLB dans le chapitre 3 de cette thèse. En effet, il a été montré que la valeur de HLB optimale pour le myristate d'isopropyle se situait aux alentours de 4,6. Or, dans le plan d'expériences présenté ici, les valeurs de HLB vont de 1,8 à 5,2. On peut remarquer que le rendement augmente lorsque l'on se rapproche de la valeur de HLB critique.

2.2. Optimisation et désirabilité

L'intérêt d'un plan d'expériences de Scheffé est de pouvoir avoir une vue d'ensemble sur le domaine d'étude mais également d'utiliser le modèle construit à des fins d'optimisation (231). Comme présenté dans l'état de l'art, il est possible, avec les plans de Scheffé, d'indiquer une désirabilité et un poids pour chaque réponse. De cette manière, grâce aux résultats des manipulations, le modèle sera capable d'identifier et de prédire le point du domaine qui correspond le plus aux attentes du manipulateur.

Les désirabilités pour chaque réponse sont présentées dans la Figure 70.

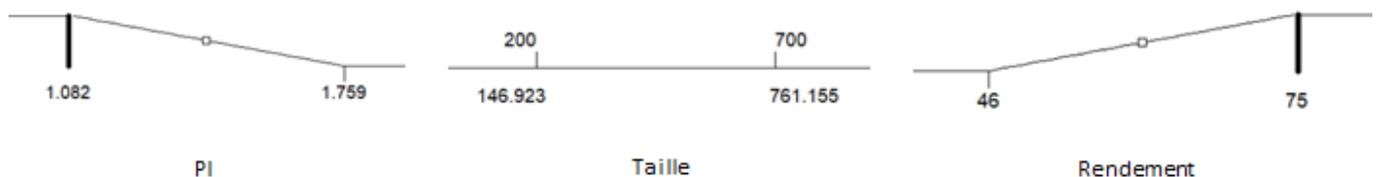


Figure 70 : Désirabilités pour chaque réponse du plan de Scheffé.

L'objectif de l'optimisation de la formulation est d'obtenir les particules avec la population de taille la plus homogène possible et le rendement le plus important. C'est pourquoi, pour les désirabilités, nous avons choisi de minimiser la valeur du PI et de maximiser celle du rendement. Cela se traduit par les courbes de la Figure 70 qui accordent plus d'importance aux petites valeurs de PI et aux grandes valeurs de rendement. La taille n'étant pas un critère de qualité des particules, nous avons fait le choix de n'y appliquer aucune désirabilité. La surface de réponse correspondante est présentée dans la Figure 71.

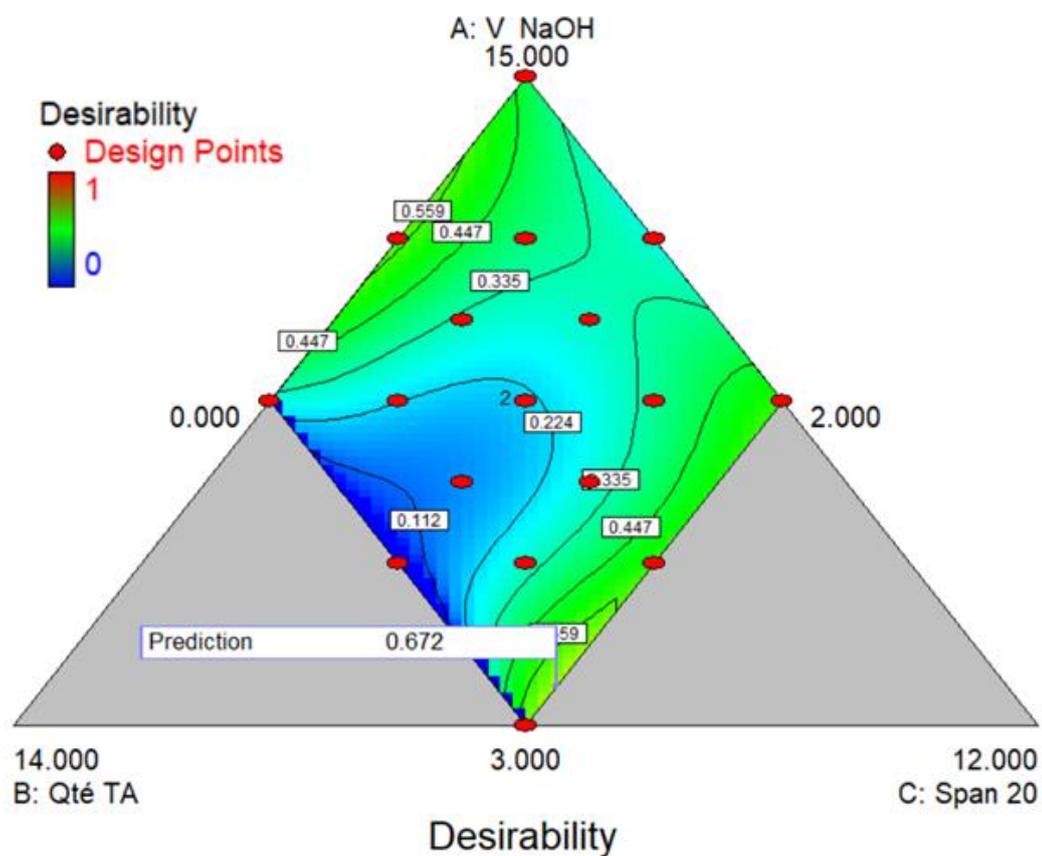


Figure 71 : Surface de réponse de la désirabilité pour le plan de Scheffé.

Cette surface de réponse prend en compte les trois facteurs et les poids indiqués sur chaque facteur pour donner en chaque point du domaine d'étude une désirabilité. Lorsque la valeur est de 1, toutes les attentes de l'expérimentateur sont parfaitement atteintes. Dans le cas contraire, avec une valeur de 0, aucune de ses attentes n'est atteinte. La valeur de désirabilité

théorique maximum qu'il est possible d'atteindre ici est de 0,67. Ce point correspond aux valeurs de facteurs suivantes :

- Quantité de tensioactifs : 7,3%
- Ratio Span 85/Span 20 : 50/50
- Volume d'éthanol à 2% en NaOH : 3,7ml

Une manipulation avec ces valeurs de facteurs a été réalisée pour vérifier l'adéquation du modèle avec l'expérience. Pour chaque réponse, une valeur est prédite et ces valeurs sont :

- Indice de polydispersité : 1,24
- Taille des particules : 206,7 μm
- Rendement : 61,7%

Les particules obtenues dans les conditions optimales présentent les caractéristiques suivantes :

- Indice de polydispersité : 1,11
- Taille des particules : 355,7 μm
- Rendement : 72,2%

Ces résultats sont satisfaisants puisque l'indice de polydispersité est faible et que le rendement est élevé (parmi les plus hauts rendements, toutes manipulations du plan d'expériences confondues). En revanche, les prédictions du modèle ne sont pas vraiment confirmées, on obtient un résultat encore plus satisfaisant qu'attendu. Le fait que la désirabilité maximum soit sur un bord du domaine d'étude pourrait expliquer cette différence. Cela montre également que les bornes du domaine d'étude ne sont pas optimales car il est possible qu'une désirabilité encore meilleure soit juste de l'autre côté de cette borne. Nous ne sommes alors pas sûr d'avoir la valeur maximum de la désirabilité car le domaine d'étude ne se montre finalement pas assez étendu. Il serait donc intéressant d'étendre le domaine d'étude pour compléter l'investigation, notamment autour de la borne qui présente la désirabilité maximum.

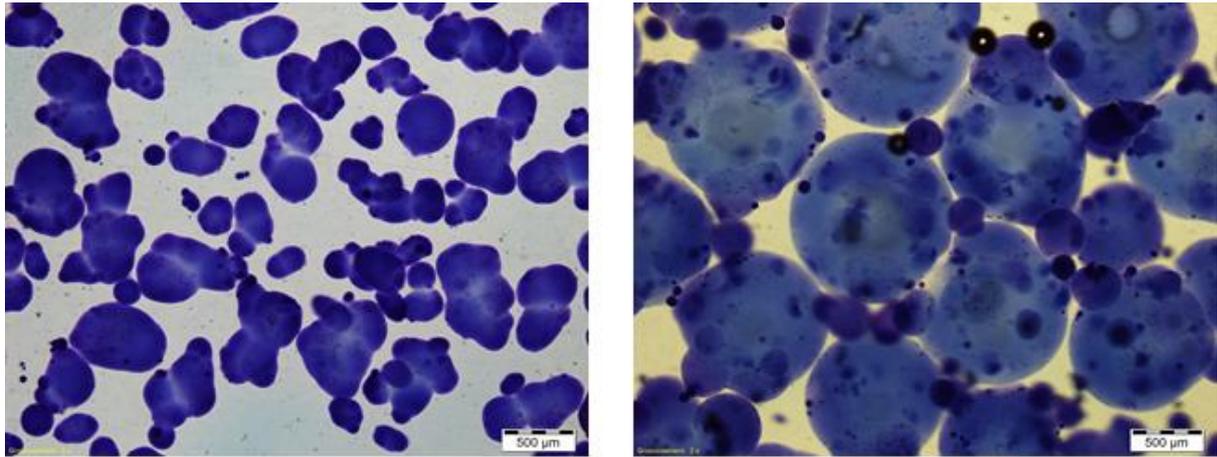


Figure 72 : A gauche : particules obtenues au point de désirabilité maximum. A droite : particules obtenues pour le point inférieur droit du triangle contenant le domaine d'étude.

Les conclusions tirées dans le paragraphe précédent ne se basent que sur des valeurs numériques qui ne prennent pas en compte l'aspect des particules. Or, ce point est également d'importance capitale pour évaluer la réussite de la manipulation. Cependant, l'aspect des particules est difficile à mesurer avec des valeurs numériques est cela est une des limites du plan d'expérience tel qu'il est présenté ici. On remarque d'ailleurs que les très bons résultats obtenus pour le point à la désirabilité maximum sont nuancés par l'aspect non satisfaisant des particules. Celles-ci ne sont pas sphériques et présentent une agrégation importante.

Nous avons choisi de réaliser une manipulation supplémentaire pour le point qui se situe dans le coin inférieur droit du triangle qui contient le domaine d'étude. Cette manipulation a pour objectif de voir si des particules peuvent être obtenues pour ces valeurs de facteurs mais également de voir si une amélioration peut être obtenue, notamment par rapport au rendement. En effet, sur la Figure 69, on peut voir que le rendement s'améliore en direction de ce sommet du triangle.

Les valeurs des facteurs étaient donc les suivantes :

- Quantité de tensioactifs : 2%
- Ratio Span 85/Span 20 : 0/100
- Volume d'éthanol à 2% en NaOH : 3 ml

Les résultats obtenus sont :

- Indice de polydispersité : 1,51
- Taille des particules : 598,0 μm
- Rendement : 61,68%

Cette fois-ci, les résultats ne font pas partie des meilleurs mais ne sont pas non plus décevants. En revanche, ils sont moins bons que ceux pour le point avec la désirabilité maximum. Cela implique que si un optimum de désirabilité existe, il se situe quelque part dans la partie inférieure droite du triangle définissant le domaine d'étude. Là encore, l'aspect des particules doit être pris en compte. Cette fois-ci, les particules sont plus sphériques mais les contours ne sont pas très nets et une légère agrégation est présente. Il serait donc intéressant, pour compléter l'étude, d'étendre les manipulations pour couvrir les zones grisées du triangle contenant le domaine d'étude.

D. Conclusions du chapitre

La mise en place des deux plans d'expériences successifs a permis de mettre en lumière plusieurs phénomènes concernant le système de fabrication de microparticules.

Dans un premier temps, la réalisation du plan factoriel complet a permis de montrer que certains facteurs ont un effet plus important que d'autres sur le procédé de fabrication. C'est le cas notamment de la nature de la phase organique. Il a été montré également que les facteurs les plus influents changent en fonction des propriétés de la phase organique. Nous observons alors une forte influence de la vitesse d'agitation et de la quantité de tensioactifs dans le cas du myristate d'isopropyle, tandis que pour l'huile de paraffine, c'est plutôt la vitesse d'agitation et la quantité de NaOH dans le système. Cette première étude a permis la mise en place du plan d'optimisation de Scheffé pour atteindre la meilleure formulation possible. Ce plan s'est cette fois construit avec uniquement trois facteurs et uniquement pour le myristate d'isopropyle.

De cette recherche d'optimisation ressortent deux principales conclusions. Dans un premier temps, il est effectivement possible d'optimiser le système et d'obtenir une désirabilité

satisfaisante. En revanche, la désirabilité maximum obtenue ici n'est pas garantie d'être la désirabilité optimum du système. Une extension du domaine d'étude est nécessaire pour parfaire cette information. Dans un second temps, il devient clair que l'utilisation unique des valeurs numériques pour décrire le système n'est pas suffisante car elle ne permet pas de décrire l'aspect des particules, qui est pourtant un point clé. Il y a donc une nécessité de faire un « sacrifice » sur la désirabilité pour favoriser l'aspect des particules.

Chapitre 5 : Modification de la pectine de betterave pour la transacylation

A. Introduction

La réaction de transacylation utilisée dans ce protocole de fabrication de microparticules nécessite deux polymères : une protéine et un polysaccharide estérifié. Le polysaccharide originel est l'alginate de propylène glycol. Dans l'optique d'amélioration et de renouvellement du protocole, d'autres polysaccharides ont été envisagés. Une famille d'intérêt particulier est celle des pectines. Contrairement au PGA, celles-ci sont naturellement estérifiées. Ces polysaccharides sont présents naturellement dans de nombreux fruits et sont donc disponibles facilement (77). Un intérêt supplémentaire est que les pectines peuvent être extraites des déchets fruitiers qui sont très nombreux, c'est donc une ressource intéressante d'un point de vue de la valorisation des déchets. Localement, plusieurs sources de pectines sont exploitables, notamment dans les déchets de l'agriculture du raisin et dans la pulpe de betterave sucrière, deux cultures abondantes en Champagne-Ardenne.

Changer un polymère dans le protocole nécessite des ajustements pour l'obtention de particules. En effet, on observe des différences de structure entre le PGA et une pectine, ce qui entraîne forcément un changement de propriétés du polymère. Un exemple concret est l'emploi d'éthanol. Dans le protocole standard, la soude est véhiculée par de l'éthanol à 95%, qui fait précipiter la pectine. Il y a donc une incompatibilité et une nécessité de changer ce solvant.

Une fois un protocole adapté développé, un autre problème se pose. La pectine étant un produit naturel, sa structure est amenée à changer en fonction de la source et de la voie

d'extraction. Ces différences de structure chimique peuvent avoir une influence sur les propriétés des polymères et par conséquent sur les particules obtenues. La particularité de la pectine de betterave est de présenter des groupements acétates le long de sa chaîne. Ces groupements lui confèrent certaines propriétés comme une plus grande activité interfaciale par rapport aux autres pectines, ce qui est particulièrement intéressant pour ce protocole qui se base sur une émulsification (78). Cette pectine présente également une plus faible capacité à gélifier en présence de cations divalents, mais cela ne devrait pas avoir d'impact sur la fabrication des microparticules. Cependant, les groupements acétates de la pectine de betterave sont susceptibles de consommer le réactif en étant la source d'une réaction parasite.

Ce chapitre va donc se concentrer sur l'adaptation du protocole standard pour l'utilisation de pectines naturelles mais également sur l'amélioration du protocole adapté en prenant en compte la structure de la pectine utilisée.

B. Matériel et méthodes

1. Adaptation du protocole aux pectines

L'adaptation du protocole standard pour les pectines avait déjà été réalisée par Imane Hedef (1) lors de sa thèse et n'a pas été changé depuis. Brièvement, le protocole est le suivant :

- Dissolution de l'HSA et de la pectine dans de l'eau avec 1,8% de NaCl.
- Emulsification de la phase aqueuse dans la phase organique qui contient 5% de Span 85 pendant 5 minutes.
- Ajout de 15 ml de solution de NaOH à 2% dans l'octanol.
- 45 minutes de réaction sous agitation.
- Ajout de 150ml de tampon imidazole pH 7.
- Lavages et rinçages habituels avec en premier de l'eau additionnée de Tween 20 à 2% puis de l'eau PPI.

Ce protocole modifié permet l'obtention de particules sphériques et bien définies en quantité jugée satisfaisante à partir de pectines. Ce protocole sera nommé par la suite comme le « protocole pectine ».

2. Déacétylation de la pectine de betterave

La déacétylation de la pectine a pu être réalisée au laboratoire de manière sélective en s'inspirant de la déacétylation de Zemplen (258) La pectine (11.24g) est solubilisée en milieu anhydre (MeOH distillé) et mise en présence de sodium solide (300mg) pendant 24 heures sous agitation. Le milieu réactionnel est ensuite neutralisé en faisant buller du CO₂ dans le ballon. La pectine est ensuite précipitée avec de l'éthanol puis filtrée et remise en solution aqueuse.

La pectine obtenue est ensuite purifiée par dialyse contre de l'eau osmosée dans un tube de dialyse (12000 – 14000 Da, T4 Cellusep, Nominal MWCO) pendant 2 jours avec changements réguliers de l'eau de dialyse. Pour évaluer la fin de dialyse la conductivité mesurée de l'eau doit devenir faible et constante. L'excès d'eau est ensuite évaporé à 50°C sous courant d'air. Le produit propre est congelé puis lyophilisé avant utilisation.

3. Caractérisation de la pectine déacétylée

Les mesures de viscosité et de tension de surface de la pectine déacétylée se font de la même manière que pour les autres polymères ou phases aqueuses. La viscosité est mesurée à l'aide d'un rhéomètre (Rhéomat RM 300) et les mesures de tension de surface à l'aide d'un tensiomètre à goutte (TECLIS Instruments).

Les spectres RMN du proton ont été réalisés avec un équipement Brücker à 500 MHz de modèle NEO. Il est équipé d'une sonde i-probe et est piloté par le logiciel topspin4.0.

C. Résultats et discussion

1. Caractérisation de la pectine de betterave déacétylée

La pectine obtenue à la suite de la déacétylation a été caractérisée de plusieurs manières, notamment en RMN, en viscosité et en tension de surface. En effet, la modification de la

structure de la pectine naturelle a de fortes chances d'en modifier les caractéristiques physico-chimiques (activité interfaciale, interactions hydrophobes/hydrophiles, viscosités...).

1.1. RMN

Pour s'assurer que la pectine a été déacétylée de manière sélective, c'est-à-dire en ne retirant que les groupements acétates et non les groupements carboxylates, des caractérisations en RMN ont été réalisées. Il est possible de s'assurer de la sélectivité car les deux fonctions esters présentent des déplacements chimiques différents.

On peut alors voir sur les spectres RMN que la réaction a bien eu lieu. En effet, le pic 2,0ppm est le pic correspondant aux groupements acétates. Celui-ci est considérablement diminué lors de la déacétylation, ce qui montre que la réaction a bien fonctionné. De plus, le pic à environ 3,75ppm correspond à celui des groupements esters méthyliques (ceux nécessaires à la réaction de transacylation), et celui-ci n'est pas altéré par la réaction. Les deux pics de l'éthanol (1,1ppm et 3,6ppm) correspondent à de l'éthanol qui a été utilisé lors de la purification par précipitation. Par ailleurs, le massif entre 3,5ppm et 5,25 ppm correspond au squelette de la pectine et l'on peut voir que celui-ci non plus n'est pas altéré par la réaction.

Ces analyses montrent bien que la réaction de déacétylation réalisée est sélective et permet de retirer uniquement les groupements acétates de la pectine sans toucher aux groupements carboxylates ou encore au squelette de la pectine. Cela présente un intérêt particulier parce que, à notre connaissance, cette réaction n'a pas été réalisée auparavant.

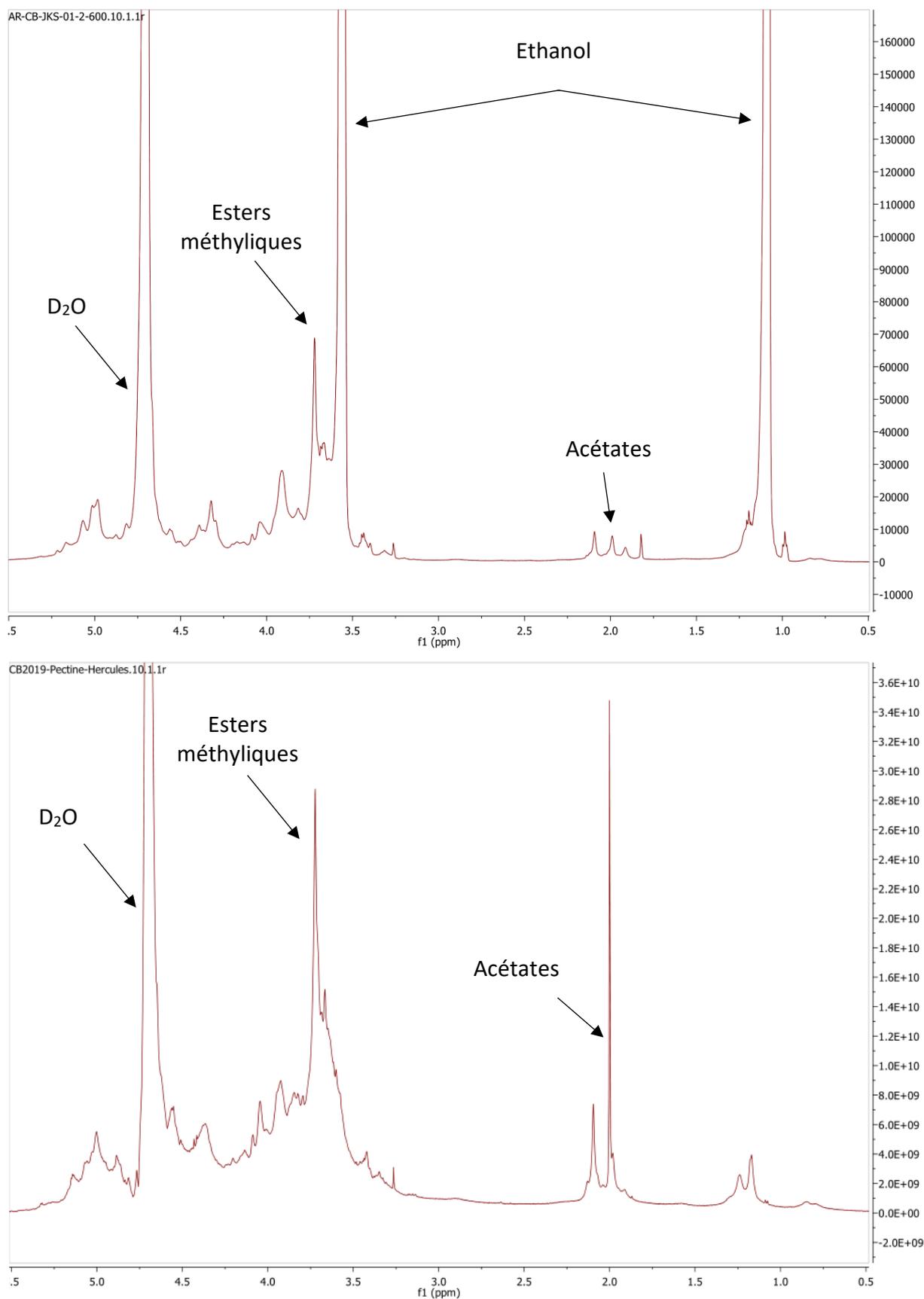


Figure 73 : En haut, spectre RMN du proton pour la pectine de betterave déacétylée. En bas, spectre RMN du proton de la pectine de betterave naturelle.

1.2. Mesures de viscosités

Les mesures de viscosité des phases aqueuses contenant la pectine déacétylée mais également la pectine naturelle ont été réalisées et comparées. Les mesures ont été réalisées sur des phases aqueuses contenant uniquement la pectine (naturelle ou déacétylée) mais également sur des phases aqueuses telles qu'elles seraient utilisées pour la fabrication de microparticules (HSA et pectine naturelle ou déacétylée). La présence de sel dans toutes les phases aqueuses permet d'étudier la phase aqueuse la plus proche du système réel utilisé pour la fabrication de microparticules.

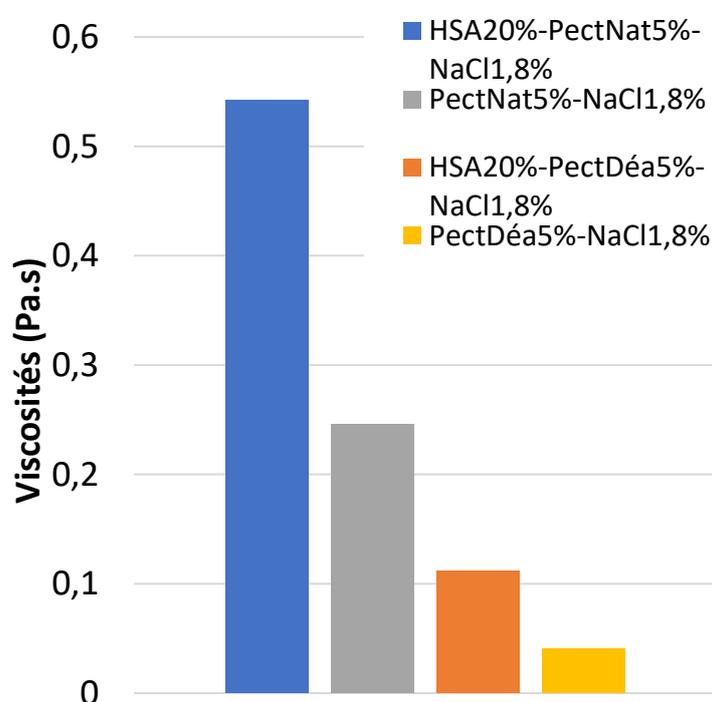


Figure 74 : Viscosités des phases aqueuses en fonction de leur composition.

Le fait de déacétyler la pectine entraîne des modifications dans ses propriétés viscosifiantes (Figure 74). La viscosité de la pectine de betterave naturelle est 6 fois plus importante que celle de la pectine déacétylée. Lors de l'ajout d'HSA dans la phase aqueuse, la viscosité de celle contenant la pectine de betterave naturelle reste 5 fois plus visqueuse que celle avec la pectine déacétylée. Lorsqu'un cycle de tension de cisaillement est réalisé sur ces mêmes phases aqueuses, leur comportement est totalement newtonien, quelle que soit la nature de

la pectine utilisée ou la composition de la phase aqueuse (Figure 75). Les groupements acétates étant plutôt hydrophobes, il est possible que ceux-ci interagissent via des interactions hydrophobes, créant davantage de cohésion et augmentant donc la viscosité de la phase aqueuse. Le fait de les retirer supprimerait ces interactions et engendrerait une baisse de la viscosité (131).

Cette modification de propriété est d'ores et déjà intéressante du point de vue de la fabrication des microparticules car une phase aqueuse moins visqueuse est plus facile à manipuler. En outre il est aussi attendu que cette différence de viscosité ait un impact sur les particules obtenues comme il sera montré plus tard.

1.3. Mesure de tensions de surface

Comme pour les mesures de viscosité, les mesures de tensiométrie ont été réalisées sur des phases aqueuses contenant uniquement de la pectine ou bien la pectine et l'HSA.

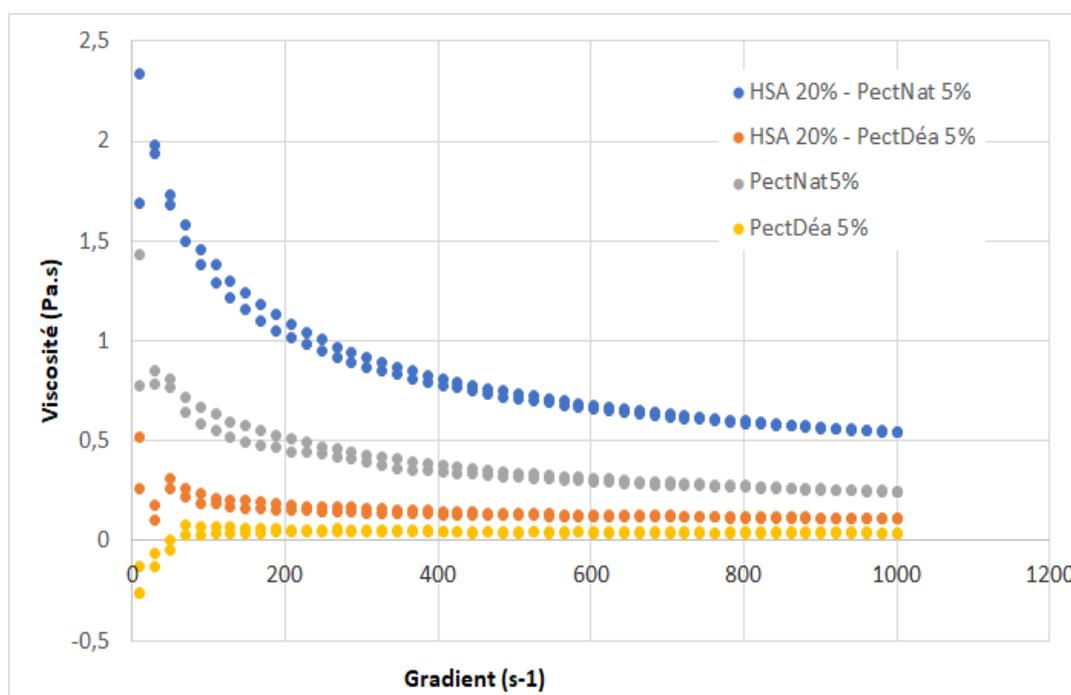


Figure 75 : Viscosités des phases aqueuses lors d'un cycle de gradient de tension de cisaillement.

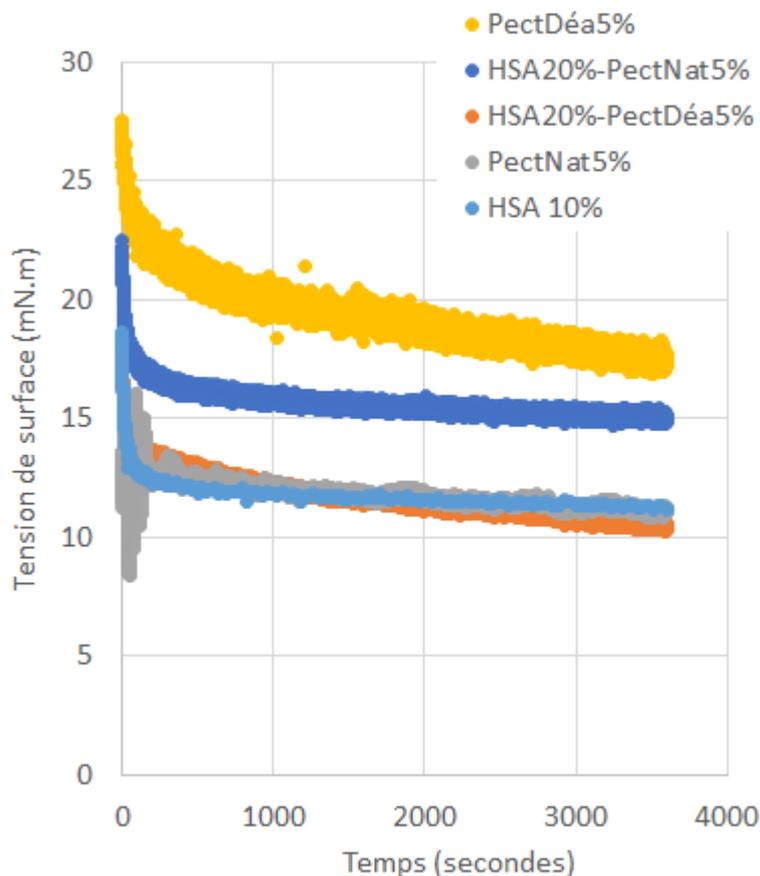


Figure 76 : Tensions de surface pour différentes phases aqueuses en fonction de leur composition.

La Figure 76 montre la tension de surface de plusieurs phases aqueuses en fonction du temps et plusieurs observations peuvent être faites. Dans un premier temps, il est clair que la phase aqueuse avec la plus faible activité interfaciale est celle contenant uniquement la pectine déacétylée (courbe jaune). Lorsque que l'on compare celle-ci avec la phase aqueuse qui contient uniquement la pectine naturelle (courbe grise) on remarque que la pectine naturelle est presque deux fois plus tensioactive que son homologue déacétylée. Il est suggéré dans la littérature que la pectine de betterave, contrairement aux autres pectines, présente des propriétés intéressantes en émulsification et est moins performante en gélification. Ces différences entre pectines sont attribuées à la présence de groupements acétates sur la pectine de betterave (et généralement absents sur les autres pectines). La mesure de tensiométrie faite ici confirme cette hypothèse puisque le fait de retirer les groupements acétates diminue la capacité de la pectine à stabiliser l'interface (110,259). Cela est cohérent

car les groupements acétates apportent une hydrophobie au squelette de la pectine, lui conférant un caractère amphiphile exacerbé, nécessaire pour avoir une activité interfaciale.

On peut remarquer que la pectine naturelle présente une activité interfaciale très similaire à celle de la protéine HSA. De plus, lorsque la pectine déacétylée est mélangée à l'HSA, l'activité interfaciale résultante est celle de l'HSA, qui prend totalement le dessus sur la pectine. En revanche lorsque la pectine naturelle et l'HSA sont mélangées, l'activité interfaciale se retrouve augmentée par rapport aux polymères seuls. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la phase aqueuse qui contient à la fois la pectine naturelle et l'HSA présente une forte viscosité qui pourrait ralentir le déplacement de ces polymères à l'interface.

2. Utilisation de la pectine déacétylée pour la fabrication de microparticules

Une fois la pectine déacétylée obtenue et sa structure confirmée, nous avons utilisé cette pectine pour la fabrication de microparticules en nous basant sur le protocole « pectine ». Le but ici est de voir si l'obtention de microparticules avec une pectine modifiée était possible et le cas échéant, comparer les particules obtenues avec celles à base de pectine naturelle.

Le protocole pectine a été utilisé avec pour seule différence, la pectine déacétylée à la place de la pectine naturelle. Des particules ont pu être obtenues de manière satisfaisante et sont présentées dans le Tableau 7.

Plusieurs différences peuvent être observées entre les deux lots de particules. Dans un premier temps, la taille des particules diffère de manière importante. En effet, avec la pectine déacétylée, les particules sont plus petites. Cela peut s'expliquer par la différence de viscosité en phase aqueuse des deux pectines. Comme montré précédemment, la pectine déacétylée rend la phase aqueuse moins visqueuse et par conséquent il est plus simple de casser les gouttelettes au sein de l'émulsion. Cela favorise la formation de particules plus petites.

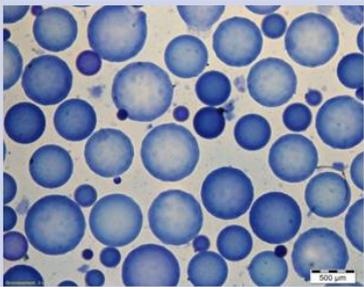
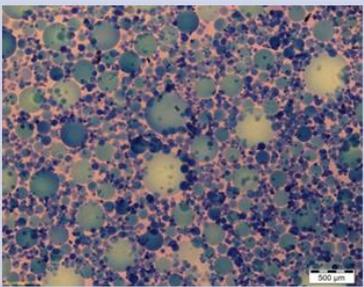
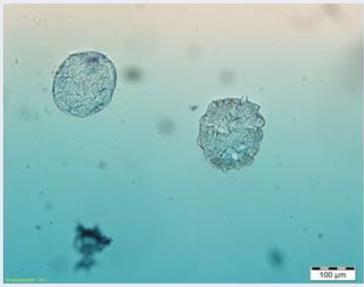
	Pectine naturelle	Pectine déacétylée
Particules		
Coupes		
Tailles (D50)	337,8 μm	228,6 μm
Indice de polydispersité	1,35	2,09

Tableau 7 : Comparatif des particules obtenues avec pectine naturelle et pectine déacétylée.

D'autre part, l'indice de polydispersité est également différent. Celui-ci traduit la dispersité de la population de particules au sein de l'échantillon et plus il est important, plus la population de particules est hétérogène. Ici, dans le cas de la pectine déacétylée, cet indice est plus élevé que pour la pectine naturelle (ce qui se traduit également sur la photo où l'on peut voir beaucoup de tailles de particules différentes). La pectine déacétylée présente une plus faible activité interfaciale et est donc moins capable de stabiliser l'interface. Cela implique directement une émulsion moins performante et donc moins homogène, entraînant des particules de tailles hétérogènes.

En ce qui concerne les structures internes des particules, celles-ci ne semblent pas si différentes l'une de l'autre. Dans les deux cas, on observe la présence d'un réseau dense jusqu'au centre de la particule, plus dentelée dans le cas de la pectine déacétylée.

3. Comparaison des rendements entre pectine naturelle et pectine déacétylée

L'objectif principal de la modification de la pectine de betterave pour retirer les groupements acétates était d'améliorer le rendement de la réaction. En effet, la présence des groupements acétates (en jaune) est source d'une réaction secondaire et parasite qui consomme du réactif. Cette réaction parasite ne conduit pas à l'établissement d'un réseau car la réaction ne se fait pas « dans le bon sens ». La protéine va se lier au groupe partant plutôt qu'au squelette du polysaccharide (voie jaune).

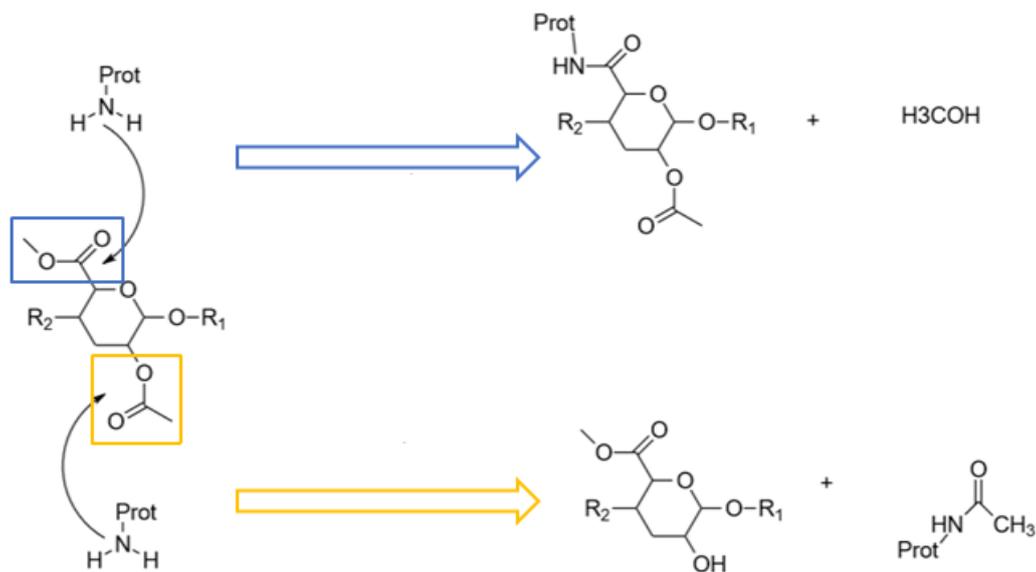


Figure 77 : Réactions de transacylation possibles. En bleu, celle qui est souhaitée pour établir le réseau. En jaune, la réaction parasite.

L'hypothèse était que le fait de retirer les groupements acétates allait permettre, tous autres paramètres constants, de faire augmenter le rendement de la réaction. Les deux lots de particules présentés ci-dessus (Tableau 7) ont été lyophilisés et les masses sèches obtenues ont été mesurées et comparées. La matière sèche initialement ajoutée dans le système, pour les deux lots, est de 1,5g, dans la phase aqueuse. Dans le cas de la pectine naturelle, la quantité

de matière sèche récupérée est de 0.3g soit un rendement de 12%. Dans le cas de la pectine déacétylée, la matière sèche récupérée est de 0.61g soit un rendement de 24,4%.

Il est donc clair que le fait de déacétyler la pectine permet de doubler le rendement de transacylation. Il est donc possible d'augmenter la valeur ajoutée de la pectine de betterave naturelle. Cependant, ces valeurs de rendement restent plutôt faibles et un travail d'optimisation peut encore être mené pour améliorer cela. Parmi les pistes possibles se trouvent le vecteur du réactif, la nature de la phase organique ou encore une modification du ratio des polymères au sein de la phase aqueuse. La voie d'extraction de la pectine à partir de la ressource naturelle peut aussi avoir une influence sur le degré d'estérification de la pectine obtenue, ce qui est un élément clé dans l'établissement du réseau et donc du rendement de la réaction (77). Une recherche dans ce sens a d'ailleurs été initiée au laboratoire.

4. Cinétiques de libération

Les particules fabriquées et les comparaisons de rendement effectuées avec succès, il était intéressant de comparer les caractéristiques des particules en termes de cinétiques de libération, pour s'assurer que celles-ci sont capables d'encapsuler un actif et de le libérer. Comme dans le cas des particules avec le PGA et l'HSA, le lysozyme a été choisi comme traceur. Le même protocole d'encapsulation est choisi, rapidement résumé :

- Imbibition des particules lyophilisées avec une solution de lysozyme pendant une nuit.
- Dispersion dans un milieu tampon PBS à 37°C.
- Mesure de la concentration en lysozyme dans le milieu à intervalle régulier.

Les résultats sont présentés dans la Figure 78. Lors des mesures de cinétiques de libération, des tubes témoins avec uniquement les particules présentes dans le milieu (sans lysozyme) sont également réalisés. Cela permet de gommer le biais de mesures qui pourrait résulter de la libération d'HSA par les particules (HSA qui entraîne une absorption à la même longueur d'onde que le lysozyme). Ainsi, par soustraction, on est certain de n'obtenir que la valeur pour le lysozyme libéré. Les résultats présentés sont ceux pour lesquels l'absorbance de l'HSA des tubes témoins a été soustraite.

Les deux courbes obtenues sont différentes (tous les points sont significativement différents, test de Student, avec $P = 0,05$). Le profil des deux courbes est identique mais les valeurs de

libération sont différentes. Ainsi, on obtient une libération de presque 100% du lysozyme pour la pectine naturelle alors que dans le cas de la pectine déacétylée, le plateau n'atteint qu'environ 85%. Cette différence dans les cinétiques de libération peut être expliquée par différents facteurs. Dans un premier temps, nous avons pu voir que les structures internes des particules étaient légèrement différentes avec une tendance plus dentelée dans le cas de la pectine déacétylée. Cela rend alors possible une meilleure pénétration du lysozyme au sein de la particule et potentiellement une meilleure rétention. Dans un second temps, le fait de retirer les groupements acétates de la pectine va changer les interactions possibles entre le lysozyme et la particule. La disparition des groupements acétates implique une augmentation de l'hydrophilie de la particule, ce qui rend le milieu plus favorable pour le lysozyme qui sera alors moins enclin à diffuser en dehors de la particule.

Néanmoins, les deux courbes montrent que pour les deux pectines, l'encapsulation du traceur est possible et que celui-ci peut être libéré à des taux satisfaisants. Cela indique que le fait de modifier la pectine pour retirer les groupements acétates n'est pas un frein pour l'encapsulation et présente alors un réel intérêt pour ce protocole de fabrication de microparticules à partir d'une ressource naturelle et locale.

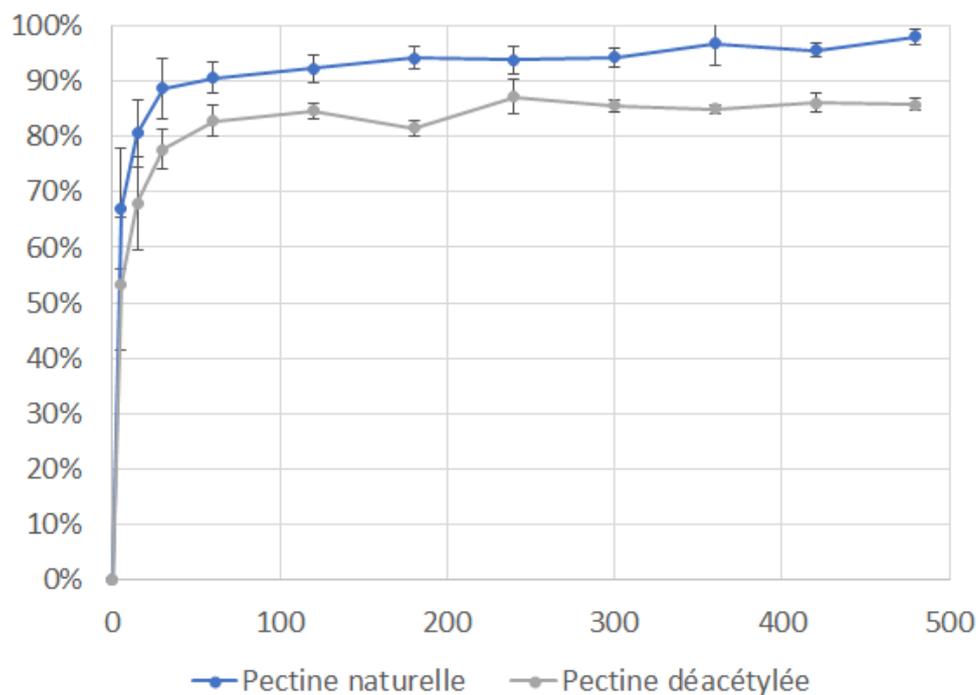


Figure 78 : Cinétiques de libération du lysozyme pour des particules à partir de pectine naturelle et de pectine déacétylée.

5. Optimisation du protocole grâce à la pectine déacétylée

Nous avons pu voir dans la partie précédente que la déacétylation de la pectine de betterave permettait de fabriquer des microparticules avec un meilleur rendement que la pectine naturelle, tout en conservant des caractéristiques intéressantes pour la microencapsulation. Nous avons souhaité optimiser davantage le protocole de fabrication dans le but de réduire la quantité de réactif ou bien de diminuer le temps de réaction.

5.1. Utilisation du protocole standard à la place du protocole pectine

Voyant que le protocole « pectine » fonctionnait très bien avec la pectine déacétylée, nous avons choisi d'essayer le protocole « standard » avec cette même pectine. Les mêmes conditions de fabrication que lorsque le PGA est utilisé a alors été mis en place. Les seules différences par rapport au protocole standard sont la conservation de l'octanol comme solvant de la soude pour éviter la précipitation de la pectine et la présence de 1,8% de NaCl dans la phase aqueuse. Les autres paramètres sont, pour rappel, les suivants :

- 6 ml de phase aqueuse émulsionnés dans 40 ml de myristate d'isopropyle à 5% en Span 85
- 4ml de solution de NaOH à 2% dans l'octanol
- 15 minutes de réaction

A la fin du protocole, aucune particule n'a été obtenue. Un des deux paramètres principaux doit alors être modifié pour obtenir des particules : soit le temps de réaction, soit la quantité de NaOH.

5.2. Réduction de la quantité de NaOH par rapport au protocole pectine

Suite aux résultats de la manipulation précédente, nous avons cette fois-ci choisi de conserver le protocole « pectine » et de ne modifier qu'un seul paramètre à la fois. Nous avons alors modifié uniquement la quantité de NaOH ajoutée en diminuant de 15 ml (protocole pectine) à 4ml tout en conservant les autres paramètres (45 minutes de réaction notamment). Cette fois-ci des objets sont obtenus mais ne peuvent pas être considérés comme particules. En effet, ceux-ci sont plutôt apparentés à des débris ou des morceaux de gel (voir tableau récapitulatif page 202).

5.3. Diminution du temps de réaction par rapport au protocole pectine

La dernière option possible pour tenter une amélioration du protocole est de diminuer le temps de réaction tout en conservant les 15ml d'octanol à 2% en NaOH. Nous avons alors diminué le temps de réaction de 45 minutes à 15 minutes. Cette fois-ci, des particules sphériques sont obtenues. Elles ne présentent pas de défaut particulier en termes de forme et ne sont pas agrégées (voir tableau récapitulatif page 202). En revanche, la dispersion de taille est plutôt hétérogène, cela peut être amélioré par la modification des paramètres de l'émulsification.

Il est donc possible, grâce à la déacétylation de la pectine, de modifier le protocole « pectine » pour l'optimiser. Le volume de solution alcaline ajouté dans le milieu ne semble pas très flexible et doit rester à 15ml pour que des particules soient obtenues. En revanche, il est possible de diminuer le temps de réaction de 45 à 15 minutes, ce qui est considérable. Cette diminution du temps de réaction ne semble pas affecter la qualité des particules obtenues.

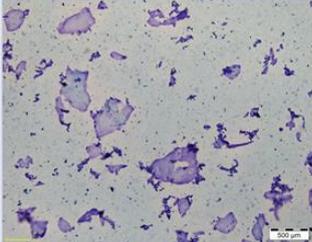
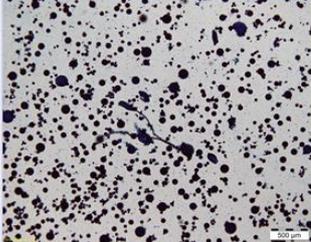
	Protocole « Standard »	Diminution de la quantité de NaOH	Diminution du temps de réaction
Volume d'octanol à 2% en NaOH	4ml	4ml	15ml
Temps de réaction	15 minutes	45 minutes	15 minutes
Particules	X		

Tableau 8 : Récapitulatif des différents essais d'optimisation avec la pectine de betterave déacétylée.

D. Conclusions du chapitre

Les chapitres précédents se focalisaient principalement sur les aspects physico-chimiques qui pouvaient avoir lieu au sein de la phase aqueuse. Dans ce chapitre, une autre approche a été mise en place.

Lors de sa thèse, Imane HADEF avait exploré la piste de la modification chimique des polymères dans le but d'apporter de nouvelles caractéristiques aux particules mais aussi d'expliquer le mécanisme de formation du réseau. Elle avait synthétisé des analogues du PGA commercial afin d'en modifier l'hydrophilie et la structure chimique. Mais ce qui nous a intéressé dans cette étude sont les recherches qu'elle avait initiées sur les pectines et principalement sur la pectine de betterave. Dans cette optique, un protocole adapté avait été développé. A la suite de cette étude s'inscrivent les résultats de ce chapitre.

Toujours dans un souci d'amélioration du protocole, nous avons réussi à retirer sélectivement les groupements acétates naturellement présents sur la pectine de betterave pour améliorer le rendement de la réaction de transacylation.

L'amélioration du rendement était le but premier de cette modification chimique mais celle-ci apporte également des modifications des propriétés de la pectine, qu'il était intéressant de mesurer. Ainsi des mesures de viscosités et de tensions de surface ont été réalisées. La pectine

déacétylée présente une viscosité et une tension de surface moindres par rapport à la pectine naturelle.

Ces différences sont intéressantes d'un point de vue pratique puisqu'elles permettent de modifier les caractéristiques des particules obtenues et en particulier les cinétiques de libération d'un traceur encapsulé.

Enfin, une optimisation du protocole de fabrication des microparticules a pu être réalisé et il a été possible de réaliser des particules avec un protocole moins exigeant en temps avec la pectine déacétylée.

Ces résultats sont très engageants et invitent à poursuivre les recherches dans cette voie. Le laboratoire s'intéresse à différentes voies d'extractions de pectines à partir de différentes sources naturelles et certains résultats semblent montrer que le degré d'estérification de la pectine obtenue est affecté. De plus, dans le cadre de notre étude, seule la pectine de betterave a été étudiée mais de nombreuses autres sources sont envisageables. Au niveau local de la Champagne-Ardenne, les déchets de la culture du raisin sont abondants et pourraient être une bonne source naturelle. Si l'on sort de la région, beaucoup d'industries agroalimentaires produisent quantité de déchets fruitiers qu'il serait intéressant de valoriser également.

Conclusion générale

La microencapsulation par transacylation est une méthode chimique développée dans le laboratoire pour la préparation de microparticules à partir de protéines, comme l'HSA, et de PGA principalement. Elle est basée sur la création de liaisons covalentes entre ces deux biopolymères dans une phase aqueuse, dispersée dans une émulsion, après ajout de soude dans le milieu. La nature des polymères utilisés ainsi que la nature du procédé font que les microparticules sont biocompatibles, biodégradables et stables.

Le premier objectif de ce travail était d'étudier le comportement des deux biopolymères au sein de la phase aqueuse et quelles répercussions cela pouvait avoir sur les particules. En effet, au sein de la phase, les deux polymères engendrent une séparation de phase liquide-liquide. Cette séparation de phase induite par des incompatibilités thermodynamiques et des interactions électrostatiques sont responsables d'une non-faisabilité des particules en dessous d'une certaine concentration en polymères dans la phase aqueuse. Cette concentration minimum avait été identifiée par Imane HADEF. Le fait d'ajouter un sel dans la phase aqueuse permet de diminuer cette séparation de phase et d'avoir une meilleure colocalisation des polymères, permettant la fabrication de particules en dessous de la concentration minimum en polymères.

L'ajout de seulement 50mM de NaCl permet l'obtention de particules dans des conditions où cela est normalement impossible. De plus, suivant la quantité de NaCl ajouté (jusqu'à 1600mM), la structure interne et la morphologie des particules sont affectées. On obtient alors des structures dentelées pour les faibles concentrations en sel et la tendance va vers une structure vésiculaire quand cette concentration augmente. En revanche lorsque la présence de sel n'est pas nécessaire pour l'obtention de particules, un ajout de sel n'a pas d'influence sur la structure des particules.

Différents sels ont été utilisés pour comparer l'effet des ions sur la séparation de phase. Il en ressort que l'effet des ions peut être corrélé avec la série de Hofmeister. Suivant le caractère chaotrope ou kosmotrope des ions, l'incidence sur la séparation de phase n'est pas la même. Plus l'ion est chaotrope, plus la réduction de la turbidité, et donc de la séparation de phase, est importante.

Conclusion générale

Il a été montré également que l'ajout de sel entraîne des effets sur les propriétés des polymères en solution. La viscosité ainsi que le comportement rhéologique de l'interface phase aqueuse/huile sont impactés par la présence de sels. L'ajout de sel dans la phase aqueuse contenant les deux polymères permet bien de diminuer les interactions électrostatiques entre eux et de diminuer la séparation de phase.

Dans le troisième chapitre, l'intérêt s'est porté sur le rôle de la phase hydrophobe dans le procédé. Une première approche a été de comparer deux phases hydrophobes, le myristate d'isopropyle et l'huile de paraffine légère. Le myristate d'isopropyle possède des fonctions esters qui peuvent être la source de réactions parasites pouvant affecter le rendement. De plus, la viscosité et l'hydrophobie de ces deux huiles sont très différentes. Cette comparaison de phases hydrophobes s'est accompagnée de comparaison de différents tensioactifs de la famille des Spans (esters de sorbitane). Les valeurs de HLB critiques de chacune des phases hydrophobes ont été déterminées, et pour cette valeur, le couple de tensioactifs le plus adapté a été recherché. Cette étude ainsi que les plans d'expériences du chapitre suivant montrent que l'huile de paraffine n'est finalement pas adaptée à ce protocole car sa forte viscosité entraîne la production de très petites particules dont la dispersion de taille est très grande et difficile à contrôler.

Le travail suivant consistait à optimiser le procédé en présence de myristate d'isopropyle et du couple de tensioactif Span 80/Span20, identifié comme le plus adapté. Plusieurs paramètres ont été modifiés tels que la vitesse et le temps d'agitation, la quantité de solution alcoolique à 2% en NaOH entre autres, le but étant de voir l'influence de ces paramètres sur la taille des particules, leur structure et le rendement de réaction. Cette partie de l'étude a d'ailleurs servi à préparer les plans d'expériences.

Le chapitre suivant s'est concentré sur l'utilisation des plans d'expériences pour l'optimisation du protocole. Une première étude dite de screening a permis d'identifier, parmi les 5 paramètres choisis, lesquels étaient les plus influents ainsi que les interactions les plus importantes entre ces facteurs. Les trois paramètres identifiés ont été utilisés pour l'étude d'optimisation grâce à un plan de Scheffé. Grâce à ce plan, la formulation « idéale » a été identifiée avec à un modèle mathématique et par rapport aux besoins de l'expérimentateur. Ces conditions optimales de formulation avec la désirabilité maximale ont été testées mais les particules obtenues ne rencontrent pas toutes les prédictions. Le protocole faisant appel à de

Conclusion générale

très nombreux paramètres, il est en effet difficile de tout maîtriser. Il est possible que le domaine d'étude choisi par l'expérience du laboratoire ne comprenne finalement pas la formulation optimale. Il est donc nécessaire, dans une prochaine étude, d'étendre le domaine d'étude pour voir si une meilleure désirabilité peut être atteinte. Cela met aussi en avant les limites des plans d'expériences : la différence entre un modèle mathématique et la réalité d'un système multi paramètres.

Enfin, dans le dernier chapitre, l'étude s'est portée sur le remplacement du PGA par une pectine modifiée. Lors de la thèse d'Imane HADEF, un protocole modifié a été mis au point de manière à rendre possible l'obtention de particules avec de la pectine de betterave. Seulement la pectine de betterave possède deux fonctions esters différentes, une utile pour la transacylation, l'autre source de réactions parasites. La réaction pour retirer ces seconds groupements a été réalisée avec succès et confirmée par RMN puis la pectine a été caractérisée de manière physicochimique. Cette pectine modifiée a été utilisée pour la production de microparticules, également avec succès. Le fait de retirer les groupements acétates permet d'augmenter le rendement de la réaction mais apporte aussi une modification des propriétés des particules en matière de libération d'un traceur.

D'autres sources de pectine sont à l'étude au laboratoire de manière à valoriser d'autres ressources locales telles que les déchets végétaux de la culture du raisin. Plusieurs voies d'extractions sont également à l'étude pour en déterminer l'influence sur les propriétés des pectines obtenues.

Bibliographie

1. HADEF I. Microparticules préparées par transacylation entre séralbumine humaine et polysaccharides estérifiés : Approche physicochimique, structurelle et fonctionnelle. PhD Thesis, Univ Reims - Champagne Ardenne. 2015;
2. Rabbani G, Ahn SN. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019;123:979–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.053>
3. Peters TJ. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. Academic Press; 1995.
4. Meloun B, Morávek L, Kostka V. Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS Lett*. 1975;58(1):134–7.
5. Carter DC, He XM, Munson SH, Twigg PD, Gernert KM, Broom MB, et al. Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science* (80-). 1989;244:1195–8.
6. He XM, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*. 1992;358(6383):209–15.
7. Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng*. 1999;12(6):439–46.
8. Fasano M, Curry S, Terreno E, Galliano M, Fanali G, Narciso P, et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*. 2005;57(12):787–96.
9. Ascenzi P, Fasano M. Allostery in a monomeric protein: The case of human serum albumin. *Biophys Chem* [Internet]. 2010;148:16–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2010.03.001>
10. Brown H. Free Amino Groups of Human Serum Albumin. *Comments Commun*. 1955;(Janvier).
11. Tessari P. Protein metabolism in liver cirrhosis: From albumin to muscle myofibrils. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2003;6:79–85.

Bibliographie

12. Doweiko JP, Nompleggi DJ. Reviews: The Role of Albumin in Human Physiology and Pathophysiology, Part III: Albumin and Disease States. *J Parenter Enter Nutr.* 1991;15(4):476–83.
13. Taverna M, Marie AL, Mira JP, Guidet B. Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann Intensive Care.* 2013;3(4):1–7.
14. Nicholson JP, Wolmarans MR, Park GR. The role of albumin in critical illness. *Br J Anaesth* [Internet]. 2000;85(4):599–610. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/bja/85.4.599>
15. Benotti P, Blackburn GL. Protein and caloric or macronutrient metabolic management of the critically ill patient. *Crit Care Med.* 1979;7(12):520–5.
16. Reinhardt GF, Myscofski JW, Wilkens DB, Dobrin PB, Mangan JE, Stannard RT. Incidence and Mortality of Hypoalbuminemic Patients in Hospitalized Veterans. *J Parenter Enter Nutr.* 1980;4(4):357–9.
17. Bunn HF, Higgins PJ. Reaction of monosaccharides with proteins: Possible evolutionary significance. *Science (80-).* 1981;213:222–4.
18. Rondeau P, Bourdon E. The glycation of albumin: Structural and functional impacts. *Biochimie* [Internet]. 2011;93:645–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.12.003>
19. Schalkwijk CG, Chaturvedi N, Twaafhoven H, Van Hinsbergh VWM, Stehouwer CDA. Amadori-albumin correlates with microvascular complications and precedes nephropathy in type I diabetic patients. *Eur J Clin Invest.* 2002;32:500–6.
20. Joseph KS, Anguizola J, Hage DS. Binding of tolbutamide to glycated human serum albumin. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2011;54:426–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.003>
21. Blache D, Bourdon E, Salloignon P, Lucchi G, Ducoroy P, Petit JM, et al. Glycated albumin with loss of fatty acid binding capacity contributes to enhanced arachidonate oxygenation and platelet hyperactivity: Relevance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2015;64:960–72.
22. Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, et al. Preparation

Bibliographie

- and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids. *J Am Chem Soc.* 1946;68(3):459–75.
23. Garcovich M, Zocco MA, Gasbarrini A. Clinical use of albumin in hepatology. *Blood Transfus.* 2009;7:268–77.
 24. Matejtschuk P, Dash CH, Gascoigne EW. Production of human albumin solution: A continually developing colloid. *Br J Anaesth.* 2000;85(6):887–95.
 25. Padashi N, Arjmand M, Rajaei S, Dabbagh A. Purification of human serum albumin by ion exchange chromatography. *J Cell Mol Anesth.* 2016;1(4):158–62.
 26. Raoufinia R, Mota A, Nozari S, Aghebati Maleki L, Balkani S, Abdolalizadeh J. A methodological approach for purification and characterization of human serum albumin. *J Immunoass Immunochem.* 2016;37(6):623–35.
 27. Burnouf T, Radosevich M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. *J Biochem Biophys Methods.* 2001;49:575–86.
 28. Latta M, Knapp M, Sarmientos P, Bréfort G, Becquart J, Guerrier L, et al. Synthesis and Purification of Mature Serum Albumin from *E. Coli*. *Nat Biotechnol.* 1987;5:1309–163.
 29. Sleep D, Belfield GP, Goodey AR. The secretion of human serum albumin from the yeast *saccharomyces cerevisiae* using five different leader sequences. *Bio/Technology.* 1990;8(1):42–6.
 30. Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, Ohda T, Ohyama M, Ohi H, et al. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *J Biosci Bioeng.* 2000;89(1):55–61.
 31. Barash I, Faerman A, Baruch A, Nathan M, Hurwitz DR, Shani M. Synthesis and secretion of human serum albumin by mammary gland explants of virgin and lactating transgenic mice. *Transgenic Res.* 1993;2(5):266–76.
 32. He Y, Ning T, Xie T, Qiu Q, Zhang L, Sun Y, et al. Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(47):19078–83.
 33. Maji B. Introduction to natural polysaccharides [Internet]. *Functional Polysaccharides*

Bibliographie

- for Biomedical Applications. Elsevier Ltd.; 2019. 1–31 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102555-0.00001-7>
34. Popper ZA, Ralet MC, Domozych DS. Plant and algal cell walls: Diversity and functionality. *Ann Bot.* 2014;114:1043–8.
 35. USDA National Organic Program. Alginates [Internet]. 2015 [cited 2021 Apr 15]. p. 23. Available from: [https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Alginates TR 2015.pdf](https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Alginates_TR_2015.pdf)
 36. Draget KI. Alginates. In: Phillips GO, Williams PA, editors. *Handbook of Hydrocolloids: Second Edition.* 2009. p. 807–28.
 37. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN., Eccleston GM. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *J Pharm Sci.* 2008;97(8):2892–923.
 38. Zimmermann H, Shirley SG, Zimmermann U. Alginate-based encapsulation of cells: Past, present, and future. *Curr Diab Rep.* 2007;7:314–20.
 39. Penman A, Sanderson GR. A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. *Carbohydr Res.* 1972;25(2):273–82.
 40. Pawar SN, Edgar KJ. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials* [Internet]. 2012;33:3279–305. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.007>
 41. Pawar SN, Edgar KJ. Chemical modification of alginates in organic solvent systems. *Biomacromolecules.* 2011;12:4095–103.
 42. Sikorski P, Mo F, Skjåk-Bræk G, Stokke BT. Evidence for egg-box-compatible interactions in calcium - Alginate gels from fiber x-ray diffraction. *Biomacromolecules.* 2007;8:2098–103.
 43. Donati I, Holtan S, Mørch YA, Borgogna M, Dentini M, Skjåk-Bræk G. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. *Biomacromolecules.* 2005;6:1031–40.
 44. Powell DA, Morris ER, Gidley MJ, Rees DA. Conformations and interactions of pectins. II. Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. *J Mol Biol.* 1982;155(4):517–31.

Bibliographie

45. Mørch ÅA, Donati I, Strand BL, Skja G. Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on Alginate Microbeads. *Biomacromolecules*. 2006;7(5):1471–80.
46. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012;37(1):106–26.
47. Skjåk-Bræk G, Grasdalen H, Smidsrød O. Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. *Carbohydr Polym*. 1989;10:31–54.
48. Timell TE. The acid hydrolysis of glycosides. IV. Hydrolysis of aldobiouronic acids. *Can J Chem*. 1964;42:1456–72.
49. Zimmermann U, Klöck G, Federlin K, Hannig K, Kowalski M, Bretzel RG, et al. Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis. *Electrophoresis*. 1992;13(1):269–74.
50. Klöck G, Frank H, Houben R, Zekorn T, Horcher A, Siebers U, et al. Production of purified alginates suitable for use in immunisolated transplantation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1994;40:638–43.
51. Carré MC, Delestre C, Hubert P, Dellacherie E. Covalent coupling of a short polyether on sodium alginate: Synthesis and characterization of the resulting amphiphilic derivative. *Carbohydr Polym*. 1991;16:367–79.
52. Marc Duval J, Delestre C, Carré MC, Hubert P, Dellacherie E. Synthesis and characterization of some covalent dextran-polyoxyethyleneglycol derivatives. *Carbohydr Polym*. 1991;15:233–42.
53. KIMICA. Application with alginates [Internet]. [cited 2020 May 4]. Available from: <https://kimica-algin.com/alginate/application/>
54. Brownlee IA, Allen A, Pearson JP, Dettmar PW, Havler ME, Atherton MR, et al. Alginate as a source of dietary fiber. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005;45(6):497–510.
55. Rößle C, Brunton N, Gormley RT, Wouters R, Butler F. Alginate Coating as Carrier of Oligofructose and Inulin and to Maintain the Quality of Fresh-Cut Apples. *J Food Sci*. 2011;76(1):19–29.
56. Saltmarsh M, Saltmarsh M. Essential guide to food additives. Royal Society of Chemistry; 2013. 294 p.

Bibliographie

57. Gray CJ, Griffiths AJ, Stevenson DL, Kennedy JF. Studies on the chemical stability of propylene glycol alginate esters. *Carbohydr Polym.* 1990;12:419–30.
58. Harholt J, Suttangkakul A, Scheller HV. Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol.* 2010;153:384–95.
59. Lara-Espinoza C, Carvajal-Millán E, Balandrán-Quintana R, López-Franco Y, Rascón-Chu A. Pectin and pectin-based composite materials: Beyond food texture. *Molecules.* 2018;23:1–35.
60. Parre E, Geitmann A. Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. *Planta.* 2005;220:582–92.
61. Geerkens CH, Nagel A, Just KM, Miller-Rostek P, Kammerer DR, Schweiggert RM, et al. Mango pectin quality as influenced by cultivar, ripeness, peel particle size, blanching, drying, and irradiation. *Food Hydrocoll [Internet].* 2015;51:241–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.022>
62. Liu J, Willför S, Xu C. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioact Carbohydrates Diet Fibre [Internet].* 2015;5:31–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.12.001>
63. Voragen F, Beldman G, Schols H. Chemistry and Enzymology of Pectins. In: McCleary BV, Prosky L, editors. *Advanced Dietary Fibre Technology.* Oxford: Blackwell Science Ltd.; 2001. p. 379–98.
64. Sriamornsak P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review. *Silpakorn Univ Int J [Internet].* 2003;206–23. Available from: <http://www.journal.su.ac.th/index.php/suij/article/viewFile/48/48>
65. Thakur BR, Singh RK, Handa AK. Chemistry and Uses of Pectin - A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1997;37(1):47–73.
66. Schols HA, Bakx EJ, Schipper D, Voragen AGJ. A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydr Res.* 1995;279:265–79.
67. Renard CMGC, Crépeau MJ, Thibault JF. Structure of the repeating units in the rhamnogalacturonic backbone of apple, beet and citrus pectins. *Carbohydr Res.*

Bibliographie

- 1995;275:155–65.
68. Yapo BM, Lerouge P, Thibault J-F, Ralet M-C. Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydr Polym.* 2007;69:426–35.
 69. Lopes da Silva JA, Rao MA. Pectins: Structure, Functionality, and Uses. In: Stephen AM, Phillips GO, Williams PA, editors. *Food Polysaccharides and Their Applications*. Taylor & Francis; 2006. p. 712.
 70. Gaspar Y, Johnson KL, Mckenna JA, Bacic A, Schultz CJ. The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Mol Biol.* 2001;47:161–76.
 71. Nothnagel EA. Proteoglycans and related components in plant cells. *Int Rev Cytol.* 1997;174:195–291.
 72. Yapo BM. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2011;86:373–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.05.065>
 73. Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol.* 2008;11:266–77.
 74. Nebenführ A, Staehelin LA. Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. *Trends Plant Sci.* 2001;6(4):160–7.
 75. Mohnen D, Bar-Peled M, Somerville C. Cell Wall Polysaccharide Synthesis. In: Himmel M, editor. *Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy*. Oxford: Miley-Blackwell; 2008. p. 94–187.
 76. Rascón-Chu A, Martínez-López AL, Carvajal-Millán E, Ponce de León-Renova NE, Márquez-Escalante JA, Romo-Chacón A. Pectin from low quality “Golden Delicious” apples: Composition and gelling capability. *Food Chem* [Internet]. 2009;116:101–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.016>
 77. Srivastava P, Malviya R. Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry - an overview. *Indian J Nat Prod Resour.* 2011;2(1):10–8.
 78. Drusch S. Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. *Food Hydrocoll.*

Bibliographie

- 2007;21:1223–8.
79. Rombouts FM, Thibault J-F. Feruloylated pectic substances from sugar-beet pulp. *Carbohydr Res.* 1986;154:177–87.
 80. Iglesias MT, Lozano JE. Extraction and characterization of sunflower pectin. *J Food Eng.* 2004;62:215–23.
 81. Díaz-Rojas EI, Pacheco-Aguilar R, Lizardi J, Argüelles-Monal W, Valdez MA, Rinaudo M, et al. Linseed pectin: Gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil. *Food Hydrocoll.* 2004;18:293–304.
 82. Ptitchkina NM, Danilova IA, Doxastakis G, Kasapis S, Morris ER. Pumpkin pectin: gel formation at unusually low concentration. *Carbohydr Polym.* 1994;23:265–73.
 83. Turquois T, Rinaudo M, Taravel FR, Heyraud A. Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: Influence of extrinsic parameters on their gelling properties. *Food Hydrocoll.* 1999;13:255–62.
 84. Pagán J, Ibarz A, Llorca M, Pagán A, Barbosa-Cánovas G V. Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. *Food Res Int.* 2001;34:605–12.
 85. Georgiev Y, Ognyanov M, Yanakieva I, Kussovski V, Kratchanova M. Isolation, characterization and modification of citrus pectins. *J BioSci Biotech* [Internet]. 2012;1(3):223–33. Available from: <http://www.jbb.uni-plovdiv.bg>
 86. Marić M, Grassino AN, Zhu Z, Barba FJ, Brnčić M, Rimac Brnčić S. An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends Food Sci Technol.* 2018;76(January):28–37.
 87. Barba FJ, Brianceau S, Turk M, Boussetta N, Vorobiev E. Effect of Alternative Physical Treatments (Ultrasounds, Pulsed Electric Fields, and High-Voltage Electrical Discharges) on Selective Recovery of Bio-compounds from Fermented Grape Pomace. *Food Bioprocess Technol.* 2015;8(5):1139–48.
 88. Zhu Z, Guan Q, Koubaa M, Barba FJ, Roohinejad S, Cravotto G, et al. HPLC-DAD-ESI-MS2 analytical profile of extracts obtained from purple sweet potato after green ultrasound-assisted extraction. *Food Chem* [Internet]. 2017;215:391–400. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.157>
89. Chemat F, Rombaut N, Meullemiestre A, Turk M, Perino S, Fabiano-Tixier AS, et al. Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innov Food Sci Emerg Technol* [Internet]. 2017;41(May):357–77. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.016>
 90. Carbonell-Capella JM, Šic Žlabur J, Rimac Brnčić S, Barba FJ, Grimi N, Koubaa M, et al. Electrotechnologies, microwaves, and ultrasounds combined with binary mixtures of ethanol and water to extract steviol glycosides and antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* leaves. *J Food Process Preserv*. 2017;41(5):1–8.
 91. Poojary MM, Orlie V, Passamonti P, Olsen K. Enzyme-assisted extraction enhancing the umami taste amino acids recovery from several cultivated mushrooms. *Food Chem* [Internet]. 2017;234:236–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.157>
 92. Grumezescu A, Holban A. Ingredients extraction by physicochemical methods in food [Internet]. Vol. 4, *Handbook of food bioengineering*. 2017. 57–71 p. Available from: <http://marefateadyan.nashriyat.ir/node/150>
 93. Crandall PG, Wicker L. Pectin Internal Gel Strength: Theory, Measurement, and Methodology. In: Fishman M, editor. *Chemistry and Function of Pectins*. Washington, DC; 1986. p. 88–102.
 94. Allwyn Sundar Raj A, Rubila S, Jayabalan R, Ranganathan TV. A Review on Pectin: Chemistry due to General Properties of Pectin and its Pharmaceutical Uses. *Open Access Sci Reports*. 2012;1(12):1–4.
 95. Fraeye I, Doungra E, Duvetter T, Moldenaers P, Van Loey A, Hendrickx M. Influence of intrinsic and extrinsic factors on rheology of pectin-calcium gels. *Food Hydrocoll*. 2009;23:2069–77.
 96. Munarin F, Tanzi MC, Petrini P. Advances in biomedical applications of pectin gels. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2012;51:681–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.07.002>
 97. Axelos MAV, Thibault J-F. The Chemistry of Low-Methoxyl Pectin Gelation. In: Walter

Bibliographie

- RH, editor. *The Chemistry and Technology of Pectin*. Academic Press; 1991. p. 109–18.
98. Sharma BR, Naresh L, Dhuldhoya NC, Merchant SU, Merchant UC. An Overview on Pectins. *Times Food Process J* [Internet]. 2006;51(June-July):44–51. Available from: <http://www.taiyolucid.com/pdf/pectin.pdf>
99. May CD. Industrial pectins: Sources, production and applications. *Carbohydr Polym*. 1990;12:79–99.
100. Blaut M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur J Nutr*. 2002;41(SUPPL. 1):11–6.
101. Makarova E, Górnas P, Konrade I, Tirzite D, Cirule H, Gulbe A, et al. Acute anti-hyperglycaemic effects of an unripe apple preparation containing phlorizin in healthy volunteers: A preliminary study. *J Sci Food Agric*. 2014;95(3):560–8.
102. Wicker L, Kim Y, Kim MJ, Thirkield B, Lin Z, Jung J. Pectin as a bioactive polysaccharide - Extracting tailored function from less. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2014;42(P2):251–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.002>
103. Andersen O, Aaseth J. Molecular mechanisms of in vivo metal chelation: Implications for clinical treatment of metal intoxications. *Environ Health Perspect*. 2002;110(SUPPL. 5):887–90.
104. Leclere L, Cutsem P Van, Michiels C. Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. *Front Pharmacol*. 2013;4(October):1–8.
105. Inohara H, Raz A. Effects of natural complex carbohydrate (citrus pectin) on murine melanoma cell properties related to galectin-3 functions. *Glycoconj J*. 1994;11:527–32.
106. Lin L, Wang P, Du Z, Wang W, Cong Q, Zheng C, et al. Structural elucidation of a pectin from flowers of *Lonicera japonica* and its antipancreatic cancer activity. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2016;88:130–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.025>
107. Jackson CL, Dreaden TM, Theobald LK, Tran NM, Beal TL, Eid M, et al. Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: Correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*. 2007;17(8):805–19.
108. Li Y, Niu Y, Wu H, Sun Y, Li Q, Kong X, et al. Modified apple polysaccharides could induce

- apoptosis in colorectal cancer cells. *J Food Sci.* 2010;75(8):224–9.
109. Sathisha U V., Jayaram S, Harish Nayaka MA, Dharmesh SM. Inhibition of galectin-3 mediated cellular interactions by pectic polysaccharides from dietary sources. *Glycoconj J.* 2007;24:497–507.
110. Leroux J, Langendorff V, Schick G, Vaishnav V, Mazoyer J. Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocoll.* 2003;17(4):455–62.
111. Souza CJF, da Costa AR, Souza CF, Tosin FFS, Garcia-Rojas EE. Complex coacervation between lysozyme and pectin: Effect of pH, salt, and biopolymer ratio. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2018;107:1253–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.104>
112. Rodriguez Patino JM, Pilosof AMR. Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2011;25:1925–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.023>
113. Xu X, Luo L, Liu C, Zhang Z, McClements DJ. Influence of electrostatic interactions on behavior of mixed rice glutelin and alginate systems: pH and ionic strength effects. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2017;63:301–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.005>
114. Niu F, Su Y, Liu Y, Wang G, Zhang Y, Yang Y. Ovalbumin – gum arabic interactions : Effect of pH , temperature , salt , biopolymers ratio and total concentration. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2014;113:477–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.012>
115. Joshi N, Rawat K, Bohidar HB. pH and ionic strength induced complex coacervation of Pectin and Gelatin A. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2018;74:132–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.011>
116. Seyrek E, Dubin PL, Tribet C, Gamble EA. Ionic Strength Dependence of Protein-Polyelectrolyte Interactions. *Biomacromolecules.* 2003;4:273–82.
117. Pihlasalo S, Auranen L, Hänninen P, Härmä H. Method for Estimation of Protein Isoelectric Point. *Anal Chem.* 2012;84:8253–8.
118. McClements DJ. Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides.

Bibliographie

- Biotechnol Adv. 2006;24:621–5.
119. Frith WJ. Mixed biopolymer aqueous solutions - Phase behaviour and rheology. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 2010;161:48–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2009.08.001>
 120. Anvari M, Pan CH, Yoon WB, Chung D. Characterization of fish gelatin-gum arabic complex coacervates as influenced by phase separation temperature. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2015;79:894–902. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.004>
 121. Dhoot AS, Naha A, Priya J, Xalxo N. Phase diagrams for three component mixtures in pharmaceuticals and its applications. *J Young Pharm*. 2018;10(2):132–7.
 122. Wijaya W, Patel AR, Setiowati AD, Van der Meeren P. Functional colloids from proteins and polysaccharides for food applications. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2017;68:56–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.003>
 123. Benichou A, Aserin A, Garti N. Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. *J Dispers Sci Technol*. 2002;23(1–3):93–123.
 124. Comert F, Malanowski AJ, Azarikia F, Dubin PL. Coacervation and precipitation in polysaccharide-protein systems. *Soft Matter* [Internet]. 2016;12:4154–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C6SM00044D>
 125. Grinberg VY, Tolstoguzov VB. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocoll* [Internet]. 1997;11(2):145–58. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X\(97\)80022-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X(97)80022-7)
 126. Patterson D. Polymer Compatibility With and Without a Solvent. *Polym Eng Sci*. 1982;22(2):64–73.
 127. Tolstoguzov VB. Protein-Polysaccharide Interactions. In: *Food Proteins and Their Applications*. 1997. p. 171–98.
 128. Damodaran S. *Food proteins and their application*. New York. 1997. 694 p.
 129. Dickinson E. Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2011;25:1966–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.001>

Bibliographie

130. Padala S, Williams PA, Phillips GO. Adsorption of Gum Arabic , Egg White Protein , and Their Mixtures at the Oil - Water Interface in Limonene Oil-in-Water Emulsions. *J Agric Food Chem.* 2009;57:4964–73.
131. Siew CK, Williams PA. Characterization of the Surface-Active Components of Sugar Beet Pectin and the Hydrodynamic Thickness of the Adsorbed Pectin Layer. *J Agric Food Chem.* 2008;56:8111–20.
132. Nahrungbauer I. Dynamic Surface Tension of Aqueous Polymer Solutions, I: Ethyl(hydroxyethyl)cellulose (BERMOCOLL cst-103). *J Colloid Interface Sci.* 1995;176:318–28.
133. Pérez OE, Sanchez CC, Rodríguez Patino JM, Pilosof AMR. Thermodynamic and Dynamic Characteristics of Hydroxypropylmethylcellulose Adsorbed Films at the Air - Water Interface. *Biomacromolecules.* 2006;7:388–93.
134. Baeza R, Sanchez CC, Pilosof AMR, Patino JMR. Interfacial and foaming properties of prolylenglycol alginates: Effect of degree of esterification and molecular weight. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2004;36(3–4):139–45.
135. Ganzevles RA, Cohen Stuart MA, Vliet T van, de Jongh HHJ. Use of polysaccharides to control protein adsorption to the air-water interface. *Food Hydrocoll.* 2006;20:872–8.
136. Kudryashova E V., Visser AJWG, Van Hoek A, De Jongh HHJ. Molecular details of ovalbumin-pectin complexes at the air/water interface: A spectroscopic study. *Langmuir.* 2007;23:7942–50.
137. Ducel V, Richard J, Popineau Y, Boury F. Rheological interfacial properties of plant protein - Arabic gum coacervates at the oil-water interface. *Biomacromolecules.* 2005;6(2):790–6.
138. Jourdain LS, Schmitt C, Leser ME, Murray BS, Dickinson E. Mixed layers of sodium caseinate + dextran sulfate: Influence of order of addition to oil-water interface. *Langmuir.* 2009;25(17):10026–37.
139. Miquelim JN, Lannes SCS, Mezzenga R. pH Influence on the stability of foams with protein–polysaccharide complexes at their interfaces. *Food Hydrocoll.* 2010;24(4):398–405.

Bibliographie

140. Baeza R, Carrera Sanchez C, Pilosof AMR, Rodríguez Patino JM. Interactions of polysaccharides with β -lactoglobulin adsorbed films at the air-water interface. *Food Hydrocoll.* 2004;18:959–66.
141. Carp DJ, Bartholomai GB, Pilosof AMR. Electrophoretic studies for determining soy proteins-xanthan gum interactions in foams. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 1999;12:309–16.
142. Baeza R, Carrera Sánchez C, Rodriguez Patino JM, Pilosof AMR. Interactions between β -lactoglobulin and polysaccharides at the air-water interface and the influence on foam properties. In: *Food Hydrocolloids: Interactions, Microstructure and Processing.* 2006. p. 306–16.
143. Ganzevles RA, Kosters H, Van Vliet T, Stuart MAC, De Jongh HHJ. Polysaccharide charge density regulating protein adsorption to air/water interfaces by protein/polysaccharide complex formation. *J Phys Chem B.* 2007;111:12969–76.
144. Ropers MH, Novales B, Boué F, Axelos MAV. Polysaccharide/surfactant complexes at the air-water interface - Effect of the charge density on interfacial and foaming behaviors. *Langmuir.* 2008;24(22):12849–57.
145. Benichou A, Aserin A, Lutz R, Garti N. Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity. *Food Hydrocoll.* 2007;21:379–91.
146. Shih Y -C, Prausnitz JM, Blanch HW. Some characteristics of protein precipitation by salts. *Biotechnol Bioeng.* 1992;40:1155–64.
147. Zhao H. Protein stabilization and enzyme activation in ionic liquids: Specific ion effects. *J Chem Technol Biotechnol.* 2016;91:25–50.
148. Kropman MF, Bakker HJ. Effect of ions on the vibrational relaxation of liquid water. *J Am Chem Soc.* 2004;126:9135–41.
149. Stryer L, Haugland RP. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1967;58(2):719–26.
150. Collins KD, Neilson GW, Enderby JE. Ions in water: Characterizing the forces that control chemical processes and biological structure. *Biophys Chem.* 2007;128:95–104.

Bibliographie

151. Zhang Y, Furyk S, Bergbreiter DE, Cremer PS. Specific ion effects on the water solubility of macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister series. *J Am Chem Soc.* 2005;127:14505–10.
152. Bakker HJ. Structural dynamics of aqueous salt solutions. *Chem Rev.* 2008;108:1456–73.
153. Asare-Addo K, Conway BR, Larhrib H, Levina M, Rajabi-Siahboomi AR, Tetteh J, et al. The effect of pH and ionic strength of dissolution media on in-vitro release of two model drugs of different solubilities from HPMC matrices. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2013;111:384–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.06.034>
154. Pegram LM, Record MT. Thermodynamic origin of hofmeister ion effects. *J Phys Chem B.* 2008;112:9428–36.
155. Long FA, McDevit WF. Activity coefficients of nonelectrolyte solutes in aqueous salt solutions. *Chem Rev.* 1952;51(1):119–69.
156. Tang CY, Allen HC. Ionic binding of Na⁺ versus K⁺ to the carboxylic acid headgroup of palmitic acid monolayers studied by vibrational sum frequency generation spectroscopy. *J Phys Chem A.* 2009;113:7383–93.
157. Ninham BW, Yaminsky V. Ion binding and ion specificity: The Hofmeister effect and Onsager and Lifshitz theories. *Langmuir.* 1997;13:2097–108.
158. Boström M, Williams DRM, Ninham BW. Specific ion effects: Why the properties of lysozyme in salt solutions follow a hofmeister series. *Biophys J.* 2003;85:686–94.
159. Boström M, Williams DRM, Stewart PR, Ninham BW. Hofmeister effects in membrane biology: The role of ionic dispersion potentials. *Phys Rev E.* 2003;68:1–6.
160. Vlachy N, Jagoda-Cwiklik B, Vácha R, Touraud D, Jungwirth P, Kunz W. Hofmeister series and specific interactions of charged headgroups with aqueous ions. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 2009;146:42–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2008.09.010>
161. Xie WJ, Gao YQ. A simple theory for the hofmeister series. *J Phys Chem Lett.* 2013;4:4247–52.

Bibliographie

162. Pegram LM, Record MT. Hofmeister salt effects on surface tension arise from partitioning of anions and cations between bulk water and the air-water interface. *J Phys Chem B*. 2007;111:5411–7.
163. Arakawa T, Timasheff SN. Mechanism of Protein Salting In and Salting Out by Divalent Cation Salts: Balance between Hydration and Salt Binding. *Biochemistry*. 1984;23(25):5912–23.
164. Endom L, Hertz HG, Thül B, Zeidler MD. A Microdynamic Model of Electrolyte Solutions as Derived from Nuclear Magnetic Relaxation and Self-Diffusion Data. *Berichte der Bunsengesellschaft für Phys Chemie* [Internet]. 1967;71(9-10):1008–31. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bbpc.19670710907/abstract>
165. Collins KD. Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. *Biophys J* [Internet]. 1997;72:65–76. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78647-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78647-8)
166. Donald H, Jenkins B, Marcus Y. Viscosity B-Coefficients of Ions in Solution. *Chem Rev*. 1995;95:2695–724.
167. Ozkan G, Franco P, De Marco I, Xiao J, Capanoglu E. A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chem*. 2019;272:494–506.
168. Shishir MRI, Xie L, Sun C, Zheng X, Chen W. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends Food Sci Technol*. 2018;78:34–60.
169. Saifullah M, Shishir MRI, Ferdowsi R, Tanver Rahman MR, Van Vuong Q. Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2019;86(September 2018):230–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.030>
170. Jamshidi A, Shabanpour B, Pourashouri P, Raeisi M. Using WPC-inulin-fucoidan complexes for encapsulation of fish protein hydrolysate and fish oil in W1/O/W2emulsion: Characterization and nutritional quality. *Food Res Int*. 2018;114:240–50.

Bibliographie

171. Sanjoy K Das, Sheba D, Rajan R, Hirak M, Tripti H, Mohanraj P, et al. Microencapsulation techniques and its practice. *Int J Pharm Sci Technol*. 2011;6(2):1–23.
172. Chen L, Remondetto GE, Subirade M. Calcium cross-linked soy protein beads and microspheres as carriers for nutraceutical compound delivery. *ACS Symp Ser*. 2009;1007:98–115.
173. Tsuiji K. Microencapsulation of pesticides and their improved handling safety. *J Microencapsul*. 2001;18(2):137–47.
174. Sopeña F, Maqueda C, Morillo E. Controlled release formulations of herbicides based on micro-encapsulation. *Cienc e Investig Agrar*. 2009;36(1):27–42.
175. Patravale VB, Mandawgade SD. Novel cosmetic delivery systems: An application update. *Int J Cosmet Sci*. 2008;30(1):19–33.
176. Schafroth N, Arpagaus C, Jadhav UY, Makne S, Douroumis D. Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2012;90:8–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.038>
177. Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res Int*. 2007;40:1107–21.
178. Schoubben A, Blasi P, Giovagnoli S, Rossi C, Ricci M. Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. *Chem Eng J*. 2010;160:363–9.
179. Shishir MRI, Chen W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2017;65:49–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.006>
180. Araujo-Díaz SB, Leyva-Porras C, Aguirre-Bañuelos P, Álvarez-Salas C, Saavedra-Leos Z. Evaluation of the physical properties and conservation of the antioxidants content, employing inulin and maltodextrin in the spray drying of blueberry juice. *Carbohydr Polym*. 2017;167:317–25.
181. Pillai DS, Prabhasankar P, Jena BS, Anandharamakrishnan C. Microencapsulation of garcinia cowa fruit extract and effect of its use on pasta process and quality. *Int J Food*

Bibliographie

- Prop. 2012;15(3):590–604.
182. Mishra P, Mishra S, Mahanta CL. Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. *Food Bioprod Process*. 2014;92:252–8.
 183. Sultana A, Miyamoto A, Lan Hy Q, Tanaka Y, Fushimi Y, Yoshii H. Microencapsulation of flavors by spray drying using *Saccharomyces cerevisiae*. *J Food Eng [Internet]*. 2017;199:36–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.12.002>
 184. Gong P, Zhang L, Han X, Shigwedha N, Song W, Yi H, et al. Injury Mechanisms of Lactic Acid Bacteria Starter Cultures During Spray Drying: A Review. *Dry Technol An Int J*. 2014;32(7):793–800.
 185. Gula A, Ren L, Zhou Z, Lu D, Wang S. Design and evaluation of biodegradable enteric microcapsules of amifostine for oral delivery. *Int J Pharm [Internet]*. 2013;453:441–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.019>
 186. Dalmoro A, Barba AA, Lamberti G, D'Amore M. Intensifying the microencapsulation process: Ultrasonic atomization as an innovative approach. *Eur J Pharm Biopharm [Internet]*. 2012;80:471–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.01.006>
 187. Xiao Z, Liu W, Zhu G, Zhou R, Niu Y. A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. *J Sci Food Agric*. 2014;94:1482–94.
 188. De Kruif CG, Weinbreck F, De Vries R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2004;9:340–9.
 189. Ezhilarasi PN, Karthik P, Chhanwal N, Anandharamakrishnan C. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food Bioprocess Technol*. 2013;6(3):628–47.
 190. Yan C, Zhang W. Coacervation Processes. In: *Microencapsulation in the Food Industry: A Practical Implementation Guide*. Gaonkar, A. G. Vasisht, N. Khare, A. R. Sobel, R.; 2014. p. 590.
 191. Dubey R, Shami TC, Bhasker Rao KU. *Microencapsulation Technology and Applications*.

Bibliographie

- Def Sci J. 2009;59(1):82–95.
192. Rutz JK, Borges CD, Zambiasi RC, Da Rosa CG, Da Silva MM. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. *Food Chem [Internet]*. 2016;202:324–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.140>
193. Silva DF, Favaro-Trindade CS, Rocha GA, Thomazini M. Microencapsulation of lycopene by gelatin-pectin complex coacervation. *J Food Process Preserv*. 2011;36(2):185–90.
194. Alencastre JB, Bentley MVLB, Garcia FS, De Moragas M, Viladot JL, Marchetti JM. A study of the characteristics and in vitro permeation properties of CMC/chitosan microparticles as a skin delivery system for vitamin E. *Brazilian J Pharm Sci*. 2006;42(1):69–76.
195. Comunian TA, Thomazini M, Alves AJG, de Matos Junior FE, de Carvalho Balieiro JC, Favaro-Trindade CS. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. *Food Res Int [Internet]*. 2013;52:373–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.028>
196. Pimentel-Moral S, Verardo V, Robert P, Segura-Carretero A, Martínez-Férez A. Nanoencapsulation strategies applied to maximize target delivery of intact polyphenols [Internet]. *Encapsulations*. Elsevier Inc.; 2016. 559–595 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-804307-3/00013-2>
197. Yeo Y, Baek N, Park K. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. *Biochem Bioprocess Eng*. 2001;6:213–30.
198. Perignon C, Ongmayeb G, Neufeld R, Frere Y, Poncelet D. Microencapsulation by interfacial polymerisation: Membrane formation and structure. *J Microencapsul*. 2015;32(1):1–15.
199. Arshady R. Preparation of microspheres and microcapsules by interfacial polycondensation techniques. *J Microencapsul*. 1989;6(1):13–28.
200. Munin A, Edwards-Lévy F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. Vol. 3, *Pharmaceutics*. 2011. 793–829 p.
201. Henckel & Cie. Process for the production of amides of alginic acid. 768,309, 1955.

Bibliographie

202. AGFA Aktiengesellschaft. Water-insoluble film forming nitrogeneous products. 962,483, 1962. p. 4.
203. McDowell RH. Method of modifying alkylene glycol alginates. 3,503,769, 1970.
204. McDowell RH. New reactions of propylene glycol alginate. *J Soc Cosmet Chem.* 1970;21:441–57.
205. Stainsby G. Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides. *Food Chem.* 1980;6:3–14.
206. Mohamed SB, Stainsby G. Ability of various proteins to form thermostable gels with propylene glycol alginate. *Food Chem.* 1984;13:241–55.
207. McKay JE, Stainsby G, Wilson EL. A comparison of the reactivity of alginate and pectate esters with gelatin. *Carbohydr Polym.* 1985;5:223–36.
208. Smidsrød O. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. *Faraday Discuss Chem Soc.* 1974;57:263–74.
209. Whittington SG. Conformational energy calculations on alginic acid I. Helix parameters and flexibility of the homopolymers. *Biopolymers.* 1971;10:1481–9.
210. Mohamed SB, Stainsby G. The digestibility of gelatin complexed with propylene glycol alginate. *Food Chem.* 1985;18(3):193–7.
211. Munin A, Callewaert M, Edwards-Lévy F. Méthodes d'encapsulation basées sur une réaction de transacylation. In: Durand A, Canselier J-P, editors. *Procédés et formulation au service de la santé.* 2011. p. 94–103.
212. Edwards-Lévy F. Interactions entre protéines et esters polysaccharidiques : application a la mise au point de nouvelles méthodes d'encapsulation. Université de Reims - Champagne Ardenne; 1994.
213. Hadeif I, Rogé B, Edwards-Lévy F. Serum Albumin-Alginate Microparticles Prepared by Transacylation: Relationship between Physicochemical, Structural and Functional Properties. *Biomacromolecules.* 2015;16(8):2296–307.
214. Hadeif I, Omri M, Edwards- Lévy F, Bliard C. Influence of chemically modified alginate esters on the preparation of microparticles by transacylation with protein in W/O

Bibliographie

- emulsions. *Carbohydr Polym.* 2017;157:275–81.
215. Munin A. *Microparticules de polyphénols réticulés par transacylation : mise au point et étude.* Reims Champagne-Ardenne; 2011.
216. Levy MC, Edwards-Levy F. Coating alginate beads with cross-linked biopolymers: A novel method based on a transacylation reaction. *J Microencapsul.* 1996;13(2):169–83.
217. de Vos P, Bučko M, Gemeiner P, Navrátil M, Švitel J, Faas M, et al. Multiscale requirements for bioencapsulation in medicine and biotechnology. *Biomaterials.* 2009;30(13):2559–70.
218. Zuidam NJ, Heinrich E. Encapsulation of aroma. In: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing.* 2010. p. 127–60.
219. Yang N. *Flavour reformulation and flavour stability* [Internet]. The University of Nottingham; 2012. Available from: http://eprints.nottingham.ac.uk/12595/1/PhD_Thesis_Ni_Yang_May12.pdf
220. Rodríguez J, Martín MJ, Ruiz MA, Clares B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. *Food Res Int* [Internet]. 2016;83:41–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.032>
221. Huang X, Brazel CS. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *J Control Release.* 2001;73:121–36.
222. Goubet I, Le Quere JL, Voilley AJ. Retention of Aroma Compounds by Carbohydrates: Influence of Their Physicochemical Characteristics and of Their Physical State. A Review. *J Agric Food Chem.* 1998;46:1981–90.
223. McClements DJ. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 2015;219:27–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2015.02.002>
224. Ji Y, Lesniak AK, Prudic A, Paus R, Sadowski G. Drug Release Kinetics and Mechanism from PLGA Formulations. *AIChE J.* 2016;62(11):4055–65.
225. Siegel RA, Rathbone MJ. Overview of Controlled Release Mechanisms. In: *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery.* 2012. p. 19–43.

Bibliographie

226. Siepmann J, Göpferich A. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;48:229–47.
227. Averina E, Allémann E. Encapsulation of alimentary bioactive oils of the Baikal Lake area into pH-sensitive micro- and nanoparticles. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2013;53(1):271–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.020>
228. Tinsson W. *Plans d'expérience : construction et analyses statistiques.* Springer Science & Business Media; 2010. 532 p.
229. Equixor I. *Comprendre les plans d'expérience.* 2016;33(0).
230. Goupy J. *Methods for experimental design: Principles and applications for physicists and chemists.* Elsevier; 1993. 448 p.
231. Goupy J. *Plans d'expériences.* *Tech l'ingénieur.* 1997;(0):1–28.
232. Phan-tan-luu R, Mathieu D. *Planification d'expériences en formulation : optimisation.* *Tech l'ingénieur* [Internet]. 2001;J2241 V1. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79851494165&partnerID=40&md5=a05004b5b1e9992f77e383218d8dc96e>
233. Maulidiani, Rudiyanto, Abas F, Ismail IS, Lajis NH. Generalized Likelihood Uncertainty Estimation (GLUE) methodology for optimization of extraction in natural products. *Food Chem.* 2018;250(January):37–45.
234. Jones D. *Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins.* U.S. Department of Agriculture; 1931. 22 p.
235. ThermExcel. *Caractéristiques physiques de l'eau (à la pression atmosphérique)* [Internet]. 2002 [cited 2021 Oct 11]. Available from: https://www.thermexcel.com/french/tables/eau_atm.htm
236. Barnes HB. Thixotropy - a review. *J Non Newton Fluid Mech.* 1997;70:1–33.
237. Louai A, Sarazin D, Pollet G, François J, Moreaux F. Effect of additives on solution properties of ethylene oxide-propylene oxide statistical copolymers. *Polymer (Guildf).* 1991;32(4):713–20.
238. Badran AA, Marschall E. *Oscillating pendant drop: A method for the measurement of*

- dynamic surface and interface tension. *Rev Sci Instrum.* 1986;57(2):259–63.
239. Cacace MG, Landau EM, Ramsden JJ. The Hofmeister series: Salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Q Rev Biophys.* 1997;30(3):241–77.
240. Hess B, Van Der Vegt NFA. Cation specific binding with protein surface charges. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(32):13296–300.
241. Lutter JC, Wu TY, Zhang Y. Hydration of cations: A key to understanding of specific cation effects on aggregation behaviors of PEO-PPO-PEO triblock copolymers. *J Phys Chem B.* 2013;117(35):10132–41.
242. Guo F, Friedman JM. Charge density-dependent modifications of hydration shell waters by hofmeister ions. *J Am Chem Soc.* 2009;131(31):11010–8.
243. Leal-calderon F, Schmitt V. *Emulsion Science: Basic principles.* 2007. 225 p.
244. Hong IK, Kim SI, Lee SB. Effects of HLB value on oil-in-water emulsions: Droplet size, rheological behavior, zeta-potential, and creaming index. *J Ind Eng Chem [Internet].* 2018;67:123–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.06.022>
245. Sternberg B, Florence AT. Preparation and properties of vesicles (niosomes) and a sorbitan triester (Span 85). *Int J Pharm.* 1994;105:1–6.
246. Fiume MM, Bergfeld WF, Belsito D V., Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, et al. Safety Assessment of Sorbitan Esters as Used in Cosmetics. *Int J Toxicol.* 2019;38(2_suppl):60S-80S.
247. Hong IK, Kim SI, Lee SB. Effects of HLB value on oil-in-water emulsions: Droplet size, rheological behavior, zeta-potential, and creaming index. *J Ind Eng Chem.* 2018;67:123–31.
248. Malvern Panalytical. D90, D50, D10, and span – for DLS? [Internet]. [cited 2021 Oct 7]. Available from: <https://www.materials-talks.com/blog/2016/08/25/d90-d50-d10-and-span-for-dls/>
249. Lee H, Jeonb TJ. The binding and insertion of imidazolium-based ionic surfactants into lipid bilayers: The effects of the surfactant size and salt concentration. *Phys Chem Chem Phys.* 2015;17(8):5725–33.

Bibliographie

250. Macedo JPF, Fernandes LL, Formiga FR, Reis MF, Nagashima T, Soares LAL, et al. Micro-emultocrit technique: A valuable tool for determination of critical HLB value of emulsions. *AAPS PharmSciTech*. 2006;7(1):1–7.
251. Physique et Matière. Paraffine [Internet]. 2010 [cited 2021 Oct 11]. Available from: <http://www.physique-et-matiere.com/paraffine.php>
252. McClements DJ. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. *Curr Opin Colloid Interface Sci* [Internet]. 2012;17(5):235–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2012.06.002>
253. Prasanna Kolluru L, Gala RP, Nagaraja Shastri P, Ubale R V. Design of experiments: A valuable “quality by design” tool in formulation development. Vol. 9, *Nanoparticulate Vaccine Delivery Systems*. 2015. 61–92 p.
254. Ripoll L, Clement Y. Polyamide microparticles containing vitamin C by interfacial polymerization: An approach by design of experimentation. *Cosmetics*. 2016;3(4).
255. Ducat E, Brion M, Lecomte F, Evrard B, Piel G. The experimental design as practical approach to develop and optimize a formulation of peptide-loaded liposomes. *AAPS PharmSciTech*. 2010;11(2):966–75.
256. Voinovich D, Campisi B, Phan-Tan-Luu R. Experimental Design for Mixture Studies. *Compr Chemom*. 2009;1:391–452.
257. Varanda C, Portugal I, Ribeiro J, Silva AMS, Silva CM. Optimization of bitumen formulations using mixture design of experiments (MDOE). *Constr Build Mater* [Internet]. 2017;156:611–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.08.146>
258. Zemplén G, Pacsu E. Über die Verseifung acetylierter Zucker und verwandter Substanzen. *Eur J Inorg Chem*. 1929;62(6):1613–4.
259. Siew CK, Williams PA. Role of protein and ferulic acid in the emulsification properties of sugar beet pectin. *J Agric Food Chem*. 2008;56(11):4164–71.
260. Tansel B, Sager J, Rector T, Garland J, Strayer RF, Levine L, et al. Significance of hydrated radius and hydration shells on ionic permeability during nanofiltration in dead end and cross flow modes. *Sep Purif Technol*. 2006;51(1):40–7.

Bibliographie

261. TPE Goutte Thibaut/Gaëtan 2014-2015.
262. Gassin P-M. Mesure de la tension superficielle par la technique de la goutte pendante. 2014.

Microencapsulation par transacylation en émulsion à partir de polymères d'origine naturelle : phénomènes physicochimiques et optimisation

La microencapsulation consiste à emprisonner une substance au sein d'une particule de taille micrométrique, dans le but de la préserver de l'environnement extérieur, de protéger l'utilisateur contre une substance agressive, ou encore de contrôler la libération de la molécule encapsulée. Au laboratoire, une méthode originale d'encapsulation par transacylation en émulsion entre l'alginate de propylène-glycol (PGA) et une protéine a été mise au point. Cette méthode est basée sur la création de liaisons amides entre les fonctions amines libres de la protéine et les groupes esters du PGA dans une phase aqueuse émulsionnée (E/H) après alcalinisation.

Le premier objectif de ce travail est d'étudier la séparation de phase liquide-liquide induite par la présence des deux polymères au sein de la phase aqueuse. Cette séparation de phase est le résultat de différentes interactions (principalement électrostatiques) entre les polymères. Le but est de comprendre l'influence de cette séparation de phase sur la faisabilité et les propriétés des microparticules. Pour cela, un sel est ajouté dans la phase aqueuse pour diminuer les interactions électrostatiques et donc la séparation de phases. Plusieurs sels de nature différente sont utilisés et comparés.

Le second objectif de cette thèse est d'optimiser le procédé et la formulation pour la production de particules. Beaucoup de paramètres sont pris en compte et modifiés de manière à obtenir une formulation optimale. Dans un deuxième temps, les plans d'expériences sont utilisés pour apporter une démarche efficace en termes de nombre de manipulations et compléter la première approche.

Enfin, le dernier objectif est de remplacer le PGA par une pectine de betterave modifiée chimiquement dans le but d'améliorer le rendement. Cette démarche s'inscrit dans une volonté de valorisation des ressources locales.

Microencapsulation, polysaccharide, protéine, interface, transacylation

Microencapsulation by transacylation in emulsion using naturally sourced biopolymers: physico-chemical phenomena and optimization

Microencapsulation is a process by which substances are trapped into micrometric particles, in order to isolate and protect the encapsulated molecules from the external environment, to protect the user from aggressive constituents, as well as to control the release profile of the encapsulated substances. In our laboratory, an original method of microencapsulation was developed, based on the use of a transacylation reaction, creating covalent bonds between proteins and propylene glycol alginate (PGA). The covalent bonds are created after alkalization of the aqueous phase of a W/O emulsion, without using bifunctional crosslinking reagent. The resulting microparticles, which are stable, biocompatible, and biodegradable, have potential applications for the delivery of active compounds for therapeutics or cosmetics.

The first objective of this work is to study the liquid-liquid phase separation induced by both biopolymers in the aqueous phase. This phase separation is the result of several interactions (essentially electrostatic) between the polymers. The aim is to understand the influence of this phase separation on the feasibility and the properties of the microparticles. For this purpose, salt is added in the aqueous phase in order to diminish the electrostatic interactions and hence the phase separation. Several salts of different nature are used and compared. The phase separation is affected and the feasibility as well as the properties of the particles are affected.

The second goal of this PhD is to optimize the process and the formulation to produce microparticles. A lot of parameters are considered and modified in order to obtain the best formulation. In a second attempt, design of experiment is used to bring an efficient way of organizing experiments and to complete the previous approach. Finally, the last objective is to substitute the PGA by a modified beet pectin in order to improve the yield. This demarche is in agreement with the objective of valorizing local resources.

Microencapsulation, polysaccharide, protein, interface, transacylation

Discipline : CHIMIE

Spécialité : Pharmaceutique

Université de Reims Champagne-Ardenne

Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR-UMR 7312 CNRS), Université de Reims Champagne-Ardenne ;

- Laboratoire de Pharmaceutique, Faculté de Pharmacie, 51, rue Cognacq-Jay, 51096 Reims.

- U.F.R. Sciences Exactes et Naturelles, Campus du Moulin de La Housse, 51687 Reims.