



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة عبد الحميد ابن باديس - مستغانم-
Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem
كلية العلوم والتكنولوجيا
Faculté des Sciences et de la Technologie

En Convention de Cotutelle Internationale de Thèse

Avec l'Université Technique « Gheorghe Asachi » Iasi. Roumanie

N° D'ordre : D...../2021

THÈSE

Présentée pour obtenir le diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : Génie des Procédés

Par

Mr. DELLALI Mohammed

THÈME

Hydrogels à base de polymères acryliques et polysaccharides portant de médicaments pour le traitement de certaines affections de la peau

Soutenue le 2021 à l'Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algérie

Devant le jury composé de :

Mr. HARRAT Charef	Pr, Université de Mostaganem	Président du jury
M ^{me} . DELAITE Christelle	Pr, Université de Mulhouse-France	Examinateur
Mr. ATANASE Leonard	Pr, Université d'Apollonia, Iasi-Roumanie	Examinateur
Mr. POPA Marcel	Pr, Université d'Iasi-Roumanie	Directeur de recherche
M ^{me} . SPAHIS Nawel	Pr, Université de Chlef	Directrice de recherche
Mr. DJENNAD Mhamed	Pr, Université de Mostaganem	Co directeur de recherche

Remerciements

*Je dois tout d'abord remercier et me prosterner devant **ALLAH**, Dieu Le Tout Puissant, qui m'aide et m'offre tout ce que j'ai aujourd'hui.*

*Au terme de ce doctorat effectué conjointement en convention cotutelle entre l'Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem. ALGÉRIE et l'Université Technique « Gheorghe Asachi » Iasi. ROUMANIE au sein du laboratoire de Biomatériaux et composites de la faculté d'Ingénierie Chimique et Protection de l'Environnement, sous la supervision de Monsieur, **le professeur POPA Marcel**. Un grand merci de m'avoir donné l'opportunité de faire un doctorat dans vos laboratoires, et de m'avoir fait confiance durant toutes ces années pour guider mon projet et de m'avoir soutenue jusqu'à sa réalisation. Je n'oublierai jamais sa patience, sa grande disponibilité, sa gentillesse et ses compétences didactiques qui m'ont éclairé sur bien des points. Je le remercie pour sa qualité d'humanité et sa sympathie en toutes circonstances. Je le remercie pour nos discussions toujours fructueuses et la grande liberté d'action qu'il m'a donnée, rendant le travail au sein de l'équipe plus qu'agréable. Travailler avec vous fut un réel plaisir et j'ose espérer que cela se reproduira dans l'avenir. Pour tout cela, très sincèrement merci.*

*Ce travail de recherche a été rendu possible grâce au financement du Programme Erasmus et je remercie le Professeur **Mahmoudi Hacene**, ex vice-recteur chargé des relations extérieurs à l'université de chlef qui m'avait toujours appris la rigueur, le sérieux et l'amour de mes travaux, et de m'avoir offert cette chance de faire mes études en Roumanie. L'expérience fut aussi enrichissante scientifiquement qu'humainement.*

*Je tiens tout particulièrement à exprimer mes plus chaleureux remerciements au **Professeur SPAHIS Nawel** qui a dirigé cette thèse. Pour sa disponibilité, son soutien et ses conseils qui ont été nombreux et importants. J'ai appris beaucoup de choses avec elle. Je lui adresse toute ma reconnaissance et mon affection et son implication avisée dans la correction de ce mémoire.*

*Je tiens également à remercier le **Pr DJENNAD M'hamed** comme codirecteur de recherche pour son aide et ses précieux conseils tout au long de notre collaboration, ainsi que pour sa bienveillance et ses encouragements à mon égard depuis mon inscription de doctorat.*

*Je voudrais remercier Monsieur **HARRAT Charef**, Professeur à l'université de Mostaganem, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, de s'être intéressé à ce travail et le temps qu'il y est consacré.*

*Un grand merci à tous les membres de mon jury de thèse, Madame **DELAITE Christelle**, **Professeur** à l'Université de Haute-Alsace, Mulhouse, France et Monsieur **ATANASE Leonard Ionut**, **Professeur** à l'université Apollonia d'Iasi, Roumanie. Je leur suis reconnaissant d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et je les remercie vivement pour toutes les remarques et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.*

*J'adresse un remerciement tout particulier au **Dr Camelia Iurciuc (Tincu)** pour son aide permanent, ses conseils et compétences qui m'ont été très utiles, tant sur le plan pratique que sur le plan théorique et pour sa grande patience. Merci de m'avoir épaulée, d'avoir répondu à chacune de mes questions.*

*J'adresse également mes remerciements au **Dr. PEPTU Catalina** et **Dr. SAVIN Corina Lenuța** du service de la microscopie électronique à balayage de l'Université technique d'Iasi en Roumanie, pour sa sympathie et sa gentillesse. Merci aussi d'avoir trouvé le temps de faire des analyses sur mes films hydrogels malgré un emploi du temps très chargé.*

Merci à tous le personnel de l'université technique d'Iasi, de l'université de Mostaganem et de l'Université de Chlef pour leurs encouragements et leurs bonnes humeurs.

J'exprime sincèrement ma gratitude notamment à ma femme, à mes enfants Tadjeddine et Bahaeddine, pour votre aide apportée au quotidien, et votre présence à mes côtés, sa bonne humeur et aussi pour sa gentillesse. Je la remercie pour son aide, son soutien moral et sa patience incroyable tout au long de ces années.

Enfin, je veux remercier infiniment mes parents, mes grands-parents, mes frères et mes sœurs qui m'ont encouragée au cours de ma recherche. Sans vous, rien de tout ce que j'ai accompli n'aurait été possible. Vous n'avez pas hésité une seconde à m'épauler pour ce voyage dans un autre pays. Je ne pourrais jamais suffisamment vous exprimer ma reconnaissance pour votre amour et votre soutien. Je les remercie pour leur disponibilité et leur soutien pendant les moments difficiles.

De manière globale, je remercie toutes les personnes qui m'ont aidée à vivre cette merveilleuse aventure et à traverser ces années en n'en gardant que de bons souvenirs.

Résumé

L'un des objectifs de notre étude était l'obtention des nouveaux hydrogels sous forme de films destinés à l'utilisation dans le domaine biomédical, à partir des polymères naturels (biodégradables) tels que le chitosane (CS), la carboxyméthylcellulose (CMC) et de protéine de lactalbumine (α -LA). Nous avons obtenu la carboxyméthylcellulose oxydée (CMCOx) par oxydation de la CMC en présence de périodate de sodium en vue de créer un nouveau groupement fonctionnel, respectivement la fonction d'aldéhyde (-CH=O) capable de réagir avec les groupements amines (-NH₂) de chitosane en formant des ponts covalents de type base Schiff (-C=N) entre les chaînes de deux polymères. L'existence des groupes aldéhydes dans la CMCOx a été mise en évidence par la spectroscopie FT-IR et RMN. Le degré d'oxydation maximal est environ de 22,9%. Des films hydrogels ont été préparés à base de CS et CMCOx par réticulation en utilisant différents rapports molaires entre les groupes aldéhydes de CMCOx et les groupes amines de CS. L'indice de conversion des groupes amines en bases de Schiff à partir des films d'hydrogels obtenus et la capacité de gonflement ont été déterminés. Plusieurs paramètres d'influence ont été mis en jeu et ont été étudiés tels que le rapport molaire entre les groupements fonctionnels engagés en réaction, le temps et la température de réticulation. Les films sélectionnés ont été caractérisés par les analyses de FTIR, MEB, TGA, résistance mécanique pour étudier l'effet de la variation des paramètres sur les propriétés et la morphologie des films. La curcumine a été immobilisée dans les films obtenus à base de CS/CMCOx et on a constaté que l'efficacité d'encapsulation a été diminuée lorsque le degré de réticulation augmente. La cinétique de libération de la curcumine à partir des films obtenus et la perméabilité de la membrane de peau ont été évaluées *in vitro* dans deux solutions de pH différentes (pH=5,5 et pH=7,4) en utilisant une cellule de diffusion Franz. L'activité antioxydante des films chargés de la curcumine a été améliorée en raison de la présence de CS. Les films d'hydrogel peuvent être optimisés pour obtenir des systèmes de libération avec des applications dermatologiques. Le complexe d'inclusion du β -cyclodextrine/ curcumine a été préparé pour améliorer la solubilité du polyphénol dans l'eau, et augmenter sa biodisponibilité, ceux-ci étant ensuite immobilisés dans des films d'hydrogels co-réticulés à base de CS, CMCOx en présence de (α -LA). Les tests de stabilité de la curcumine immobilisée à la lumière et aux pH confirment que la matrice polymérique des hydrogels obtenus à base de CS/LA réticulé avec la CMCOx chargé du complexe d'inclusion assure une meilleure protection contre la dégradation du curcumine. La cinétique de libération de la curcumine immobilisée à partir des films CS/LA/CMCOx a été étudiée dans deux milieux de pH différents (5,5 et 7,4).

Mots clés: chitosane; carboxyméthylcellulose oxydée; α -Lactalbumine ; hydrogel; curcumine; système de libération.

Abstract

The main aim of our work was the obtaining of a new hydrogels in the form of films intended for use in the biomedical field, from natural (biodegradable) polymers such as chitosan (CS), carboxymethylcellulose (CMC) and whey protein (α -LA). We obtained oxidized carboxymethylcellulose (CMCOx) by oxidation of CMC in the presence of sodium periodate in order to create a new functional group, respectively the aldehyde function ($-\text{CH} = \text{O}$) capable of reacting with amine groups ($-\text{NH}_2$) of chitosan by the variation of the molar ratio in formation of covalent bridges of the schiff base type ($-\text{C} = \text{N}$) between the chains of two polymers. The aldehyde groups' presence in the (CMCOx) was demonstrated by FT-IR and NMR spectroscopy, the maximum oxidation degree being 22.9%. Hydrogel films were prepared based on CS and CMCOx by solvent evaporation using different molar ratios between the aldehyde groups of CMCOx and the amine groups of CS. The amino groups' conversion index into Schiff bases from the hydrogel films obtained and the swelling degrees were determined. The influencing factors such as the molar ratio, the cross-linking temperature, and time were studied. The selected films were characterized and identified by the analyzes of FTIR, SEM, TGA and the mechanical test to study the effect of the variation of the parameters and the morphology of the films. Curcumin was immobilized in the CS/CMCOx films obtained using different molar ratios between the aldehyde groups from CMCOx and amino groups from CS. Encapsulation efficiency decreases when the cross-linking degree increases. The curcumin release kinetics from films and skin membrane permeability were evaluated in vitro in two different pH solutions (5.5 and 7.4) using a Franz diffusion cell. The curcumin-loaded films' antioxidant activity was improved due to the CS presence. The hydrogel films can be optimized to obtain release systems with dermatological applications. Inclusion complexes of curcumin with β -cyclodextrin to increase its water solubility have been obtained, these being subsequently immobilized in co-reticulated hydrogel films based on polysaccharides (chitosan, oxidized carboxymethyl cellulose) and proteins (α -lactalbumin) in order to treat especially dermatological diseases. The stability tests of curcumin immobilized to light and to pH confirm that the polymer matrix of the hydrogels obtained based on CS / LA/CMCOx loaded with the inclusion complex has a protective role for curcumin against degradation. The release kinetics of immobilized curcumin from CS / LA / CMCOx films was studied in two mediums of different pH (5.5 and 7.4).

Keywords : chitosan , oxidized carboxymethylcellulose, α -Lactalbumine , hydrogel, curcumin , release system.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو الحصول على الهلاميات المائية الجديدة على شكل أفلام أو أغشية هلامية مخصصة للاستعمال في مجال الطب الحيوي ، انطلاقا من البوليمرات الطبيعية (القابلة للتحلل الحيوي) مثل الكيتوزان ، الكربوكسي ميثيل السلولوز والبروتين الممثل في اللاكتالوبومين. لقد تحصلنا على كربوكسي ميثيل سلولوز مؤكسد عن طريق أكسدة كربوكسي ميثيل سلولوز في وجود بيروكسيدات الصوديوم من أجل إنشاء مجموعة وظيفية جديدة تسمى وظيفية الألدهيد القادرة على التفاعل مع وظيفية مجموعات الأمين من الكيتوزان بواسطة التغير في النسبة المولية بين الوظيفيتين المذكورتين لكنا السلسلتين من البوليمرات وهذا من أجل تكوين الجسور التساهمية حسب قاعدة شيف. أثبتت التحاليل المبينة في تقنية التحليل الطيفي لأشعة تحت الحمراء وتقنية الرنين المغناطيسي النووي على تواجد مجموعات الألدهيد في عديد السكريات المعدل والناتج عن الأكسدة ، حيث بلغت درجة الأكسدة القصوى حوالي 22.9% ، وعلى هذا الأساس تم تحضير أغشية الهلاميات المائية انطلاقا من الكربوكسي ميثيل سلولوز المؤكسد الناتج و الكيتوزان عن طريق تبخير المذيبات باستخدام نسب مولارية مختلفة بين مجموعات الألدهيد في الكربوكسي ميثيل سلولوز المؤكسد ومجموعات الأمين في الكيتوزان . لقد تم حساب وتحديد قدرة انتفاخ الهلاميات المائية المشكلة وكذلك حساب معامل تحويل المجموعات الأمينية إلى قواعد شيف من الهلاميات المائية. عدة عوامل مؤثرة تمت دراستها وأخذها بعين الاعتبار من بينها النسبة المولية ، الزمن ودرجة حرارة الارتباط المتشابك. العينات المختارة تم اختبارها وتشخيصها بتقنيات مختلفة نذكر منها تقنية التحليل الطيفي لأشعة تحت الحمراء ، تقنية المسح المجهر الإلكتروني ، تقنية التحليل الوزني الحراري وأيضا قياس المقاومة الميكانيكية . هذه الدراسة أجريت من أجل معاينة مدى تأثير العوامل المتغيرة. وبعد ذلك تم تثبيت الكركمين في الأغشية الهلامية التي تم الحصول عليها بناءً على الكيتوزان و الكربوكسي ميثيل سلولوز المؤكسد، بحيث لوحظ انخفاض فعالية التثبيت بدلالة زيادة درجة التشابك . تم تقييم ودراسة حركية إطلاق الكركمين من الاغشية الهلامية المحصل عليها وكذا نفاذية غشاء الجلد في محلولين مختلفين (وسط حمضي ووسط قاعدي) باستخدام خلية انتشار تسمى خلية فرانز. كانت نسبة فعالية الإطلاق الناتجة أعلى في الوسط القلوي ، ومع ذلك ، كان هناك امتصاص مكثف للكركمين في غشاء الجلد في الوسط الحمضي الضعيف بسبب تفاعل المجموعات الأمينية مع بروتينات الجلد. تم كذلك تحسين نشاط مضادات الأكسدة للأغشية المحملة بالكركمين بسبب وجود الكيتوزان ، الأغشية الهلامية المصنعة يمكن تحسينها للحصول على نظام اطلاق يتوافق مع تطبيقات الأمراض الجلدية. قمنا بتحضير مركب تضمين الكركمين مع حلقة الدكستريين لتحسين قابلية ذوبانه في الماء ، وبالتالي إضافة زيادة توافره الحيوي ثم تم تثبيته في أغشية من الهلاميات المائية المتشابكة من الكيتوزان و الكربوكسي ميثيل سلولوز المؤكسد وفي وجود بروتئين اللاكتالوبومين وتطبيقاتها على وجه الخصوص في علاج بعض الأمراض الجلدية. أكدت نتائج اختبارات ثبات واستقرار الكركمين المثبت في الضوء وفي أوساط مختلفة بأن مصفوفة البوليمر للهلاميات التي تم الحصول عليها بناء على أساس الكيتوزان و اللاكتالوبومين المتشابكة مع الكربوكسي ميثيل سلولوز المؤكسد المحمل بمركب التضمين تعتبر أحسن حماية ضد تدهور الكركمين ، في وجود الضوء وكذا في الوسائط الحامضية والقاعدية ، ثم أجريت دراسة حركية إطلاق الكركمين المثبت في الأغشية الهلامية المحضرة من الكيتوزان و اللاكتالوبومين و الكربوكسي ميثيل سلولوز المؤكسد في وسطين مختلفين(حمضي و قاعدي).

الكلمات المفتاحية. الكيتوزان ، الكربوكسي ميثيل السلولوز المؤكسد ، اللاكتالوبومين ، الاغشية الهلامية ، تثبيت الكركمين ، ظاهرة الاطلاق

Sommaire

Liste des abréviations et des symboles	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale.....	1

Partie bibliographique

Chapitre I : Aperçu général sur les polysaccharides et leurs modifications chimiques

I.1 Introduction.....	6
I.2 Les polymères naturels (biopolymères).....	6
I.3. Généralités sur les polysaccharides.....	6
I.4. Polysaccharides utilisées pour l'obtention des hydrogels pour bioapplication.....	9
I.4.1 Chitosane.....	9
I.4.1.1 Origine et structure.....	9
I.4.1.2 La structure et propriétés du chitosane.....	11
a) Viscosité.....	12
b) Solubilité.....	12
c) Cristallinité.....	12
d) Biodégradabilité.....	13
e) Biocompatibilité.....	13
f) Bioadhésion.....	13
g) Activité antimicrobienne.....	14
I.4.1.3. Paramètres influençant les propriétés des films de chitosane.....	14
a) Masse moléculaire moyenne.....	14
b) Degré de désacétylation.....	15
c) Nature de solvant.....	15
I.4.1.4. Les applications actuelles du chitosane et de ses dérivés.....	15
I.4.2. Carboxyméthylcellulose (CMC).....	16
I.4.2.1 Origine et structure.....	16
I.4.2.2 Propriétés fonctionnelles de la CMC.....	17
I.5 Protéines utilisés pour l'obtention des hydrogels pour bioapplications.....	18
I.5.1 α -Lactalbumine.....	19
a) La séquence primaire de l' α -lactalbumine.....	19
b) La structure secondaire de l' α -lactalbumine.....	20
I.5.2 Caséine.....	20
I.5.2.1 Composition et propriétés du caséine.....	21
I.6. Modifications chimiques des polysaccharides en vue de leur transformation dans les dérivés hydrosolubles pour l'obtention des hydrogels.....	22
I.6.1. Carboxyméthylation.....	22

I.6.2. Oxydation.....	24
I.6.2.1. Oxydation par le periodate (NaIO ₄).....	24
I.6.2.2. Oxydation par le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	26
I.6.2.3. Oxydation par le chlorite de sodium (NaClO ₂).....	26
I.6.2.4. Oxydation par le permanganate de potassium (KMnO ₄).....	27
I.7. Conclusion.....	28

Chapitre II : Obtention des hydrogels sous forme de films à base de polysaccharides et des protéines et leurs utilisations pour bioapplications

II.1. Introduction.....	29
II.2. Considérations générales sur les hydrogels.....	29
II.2.1. Définition des hydrogels.....	30
II.2.2. Classification des hydrogels.....	32
II.3. Hydrogels de chitosane (référence).....	33
II.4. Mécanismes de formation des hydrogels.....	35
II.4.1. Les gels physiques.....	35
II.4.2. Les gels chimiques.....	36
II.5. Caractérisation des gels chimiques.....	38
II.6. Méthodes pour l'obtention des hydrogels.....	38
II.6.1. Obtention des hydrogels par réticulation ionique.....	38
II.6.2. Obtention des hydrogels par interactions hydrogène.....	39
II.6.3. Obtention des hydrogels par interactions hydrophobes.....	40
II.6.4. Obtention des hydrogels par réticulation covalente.....	40
II.7. Utilisation des hydrogels pour de bioapplications.....	41
II.7.1. Hydrogels à base de polymères biocompatibles et biodégradables pour applications biomédicales.....	42
II.7.2 Critères et principales propriétés pour la conception d'hydrogels injectables.....	42
II.7.2.1. Cinétique de gélification.....	43
II.7.2.2. Propriétés de gonflement dans des milieux aqueux.....	43
II.7.2.3. Propriétés mécaniques.....	43
II.7.2.4. Porosité.....	44
II.7.2.5. Biocompatibilité.....	44
II.7.2.6. Biodégradabilité.....	44
II.7.3. Caractéristiques des hydrogels biocompatibles.....	45
II.8. Applications biomédicales des hydrogels.....	45
II.9. Conclusion.....	47

Chapitre III : Curcumine : structure, propriétés, activité biologique, avantages et désavantages

III .1 Introduction.....	48
--------------------------	----

III .2 Historique.....	48
III .3 Définition, structure : Aspect, utilité de la curcumine.....	49
III .4 Les principaux composés du curcuma.....	49
III .5 Propriétés physico-chimiques de la curcumine.....	51
III .5.1 Solubilité de la curcumine.....	51
III .5.2 Spectre d'absorption UV de la curcumine.....	52
III .5.3 Stabilité de la curcumine.....	52
III .6. Propriétés pharmacocinétiques de la curcumine.....	53
III .6.1 Par voie orale.....	53
a) Absorption.....	53
b) Distribution.....	53
c) Métabolisation.....	54
d) Élimination.....	54
III.7 Avantages de la curcumine.....	55
III .7.1 Activités biologiques de la curcumine.....	55
a) Activité antioxydante.....	55
b) Activité anti-inflammatoire.....	55
c) Activité anticancéreuse.....	56
d) Activité antidiabétique.....	56
III .8 Inconvénients de la curcumine.....	57
III .9. Les cyclodextrines.....	57
III .9.1 Définition, structure et utilité.....	57
III .10. Mécanismes de libération par gonflement suivi d'une diffusion.....	59
III .10.1 Les facteurs influençant la libération d'un principe actif à partir des matrices hydrophiles.....	59
III .10.2 Cinétiques de libération d'un principe actif.....	59
III .11 Conclusion.....	60

Partie expérimentale / Résultats originaux

Chapitre IV: Matériel et méthodes expérimentales : synthèses et caractérisations

IV.1. Introduction.....	61
IV.2. Matériaux et réactifs utilisés.....	61
IV.3. Méthodes de modification chimique des polysaccharides.....	62
IV.3.1. Préparation de la carboxyméthylcellulose oxydée (CMCO _x).....	62
IV.3.2. Détermination quantitative des groupes aldéhydes obtenus dans la CMCO _x	63
IV.3.3. Etude de la cinétique d'oxydation de CMC par la détermination du degré d'oxydation.....	64
IV.3.4. Détermination du poids moléculaire de CMC et CMCO _x par la méthode viscosimétrique.....	64

IV.4. Obtention du complexe d'inclusion de la curcumine dans le β -cyclodextrine.....	65
IV.5. Méthodes d'obtention des hydrogels.....	66
IV.5.1. Obtention des films à caractère d'hydrogel réticulés de manière covalente avec le chitosane (CS), lactalbumine (LA) et la carboxyméthylcellulose oxydé (CMCOx).....	66
IV.5.1.1. Préparation des films hydrogels à base de Chitosane/CMCOx.....	66
IV.5.1.2. Protocole d'inclusion de la curcumine dans les films à caractère d'hydrogel (CMCOx/CS).....	68
IV.5.1.3. Préparation des films hydrogels à base de Chitosane/CMCOx/ α -LA.....	68
IV.5.1.4. Immobilisation du complexe d'inclusion β -cyclodextrine /curcumine dans les films à base de CS/LA /CMCOx.....	69
IV.6. Méthodes de caractérisations physico-chimiques des hydrogels.....	70
IV.6.1. Méthodes spectrales (IR, RMN et UV).....	71
IV.6.1.1. Spectrophotométrie infrarouge (FTIR).....	71
IV.6.1.2. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (^1H RMN et ^{13}C RMN).....	71
IV.6.1.3. Spectrophotométrie ultraviolet visible (UV-Vis).....	72
IV.6.2. Dosage des protéines totales de lactalbumine.....	73
IV.6.3. Dosage des groupements amines libres des protéines de lactalbumine et des films avec le chitosane.....	74
IV.6.4. Méthode de détermination du $\text{DC}_{\text{amine}}(\%)$ des groupements amines dans les bases Schiff pour les films d'hydrogels obtenus.....	76
IV.6.5. Microscopie électronique à balayage (MEB).....	77
IV.6.6. Etude thermique.....	78
IV.6.6.1. Analyse thermogravimétrique (ATG).....	78
IV.6.7. Tests mécaniques - Essais de traction.....	78
IV.6.8. Détermination des caractéristiques de gonflement des films hydrogels.....	79
IV.6.9. L'inclusion de la curcumine dans les films hydrogels obtenus.....	80
IV.6.9.1. Détermination de l'efficacité d'encapsulation de la curcumine dans les films de CS/CMCOx.....	80
IV.6.10. Etude de la cinétique de libération de la curcumine dans les films hydrogels à base de CS/CMCOx.....	82
IV.6.11. Etude de la cinétique de libération de la curcumine dans les films hydrogels à base de CS/LA/CMCOx.....	84
IV.6.12. Modélisation mathématique des profils de libération.....	85
IV.6.13. Etude de stabilité de la curcumine immobilisée dans les films à la lumière.....	86
IV.6.14. Etude de stabilité de la curcumine immobilisée dans les films au pH.....	87
IV.6.15. Etude de l'activité antioxydante de la curcumine libre et immobilisée dans les films de CS/CMCOx.....	88
IV.6.15.1. Activité anti-radicalaire par la méthode du DPPH.....	88
IV.7. Conclusion.....	90

Chapitre V: Films à caractère d'hydrogel réticulés par voie covalente avec le chitosane (CS) et la carboxyméthylcellulose oxydée (CMCOx)

V.1 Introduction.....	91
V.2. Obtention de la carboxyméthylcellulose oxydée (CMCOx).....	92
V.2.1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) (CMC et CMCOx).....	92
V.2.2. Caractérisation par résonance magnétique nucléaire (RMN).....	94
V.2.3. Détermination de la teneur des groupements aldéhydes du CMCOx.....	97
V.2.4. Mécanisme d'oxydation de la CMC.....	97
V.2.5. Cinétique de l'oxydation du CMC.....	98
V.2.6. Influence du temps de la réaction sur le degré d'oxydation.....	99
V.2.7. Détermination du poids moléculaire.....	101
V.3. Obtention des hydrogels sous forme de films à base de CS et CMCOx.....	102
V.3.1. Structure des hydrogels par la réticulation covalente de CS et de CMCOx.....	104
V.3.2. Détermination de la consommation des groupements amines par le test de ninhydrine.....	106
V.3.3. Détermination du nombre de groupements amines réagissant dans les films de CS réticulé avec la CMCOx.....	106
V.3.4. Paramètres d'influence sur le taux de réticulation des hydrogels à base de CS réticulé avec la CMCOx.....	108
V.3.4.1. Influence du taux de réticulant : le rapport molaire entre les groupements -CH=O/NH ₂	108
V.3.4.2. Influence du temps.....	112
V.3.4.3. Influence de la température.....	113
V.4. Caractérisation des films obtenus à base de chitosane et CMCOx.....	115
V.4.1. Analyse spectrale FTIR des films obtenus (CS/CMCOx).....	115
V.4.2. Analyse de la morphologie des films par microscopie électronique à balayage (MEB).....	117
V.4.3. Propriétés thermiques des films.....	119
V.4.3.1. Analyse thermique différentielle (ATG).....	119
V.4.4. Propriétés mécaniques des films.....	122
V.4.4.1. Essais mécaniques de traction.....	122
V.4.5. Capacité des films d'hydrogel à absorber les solutions aqueuses.....	123
V.4.5.1. Influence de la température de réticulation sur le degré de gonflement des films hydrogels.....	124
V.4.5.2. Influence du temps de la réticulation sur le degré de gonflement.....	126
V.4.5.3. Influence du rapport molaire -CHO/-NH ₂ sur le degré de gonflement.....	128
V.5. Capacité des hydrogels d'inclure et libérer la curcumine.....	130
V.5.1. Capacité des films d'encapsuler la curcumine.....	130

V.5.2. Capacité des films de libérer la curcumine (analyse de la perméabilité transdermique <i>in vitro</i> par cellules de diffusion verticale de Franz).....	131
V.6. Analyse de l'activité antioxydante de la curcumine immobilisée.....	136
V.7. Conclusion.....	140

Chapitre VI : Immobilisation de la curcumine sous forme de complexe d'inclusion dans la β -cyclodextrine, dans les hydrogels à base de chitosane, lactalbumine et la carboxyméthylcellulose oxydée

VI.1. Introduction.....	142
VI.2. Obtention des hydrogels sous forme films à base de chitosane et de lactalbumine réticulés avec la CMCOx, sans et avec le complexe d'inclusion de la curcumine.....	143
VI.3. Analyse des groupements amines libres de lactalbumine.....	144
VI.4 Capacité des films hydrogels d'inclure le complexe curcumine/ β -cyclodextrine..	145
VI.5. Analyse du taux de réticulation des films à base de CS/LA/CMCOx non-chargés avec le complexe d'inclusion curcumine/ β -cyclodextrine.....	146
VI.6. Analyse du taux de réticulation des films à base de chitosane, lactalbumine et CMCOx qui contiennent le complexe d'inclusion curcumine/ β -cyclodextrine.....	148
VI.7. Etude du degré de gonflement dans les solutions tampons des hydrogels à base de CS et LA réticulés avec la CMCOx.....	149.
VI.8. Etude du degré de gonflement dans les solutions tampons des films hydrogels à base de CS /LA/CMCOx qui contiennent le complexe d'inclusion de la curcumine....	151
VI.9. Stabilité de la curcumine immobilisée à la lumière.....	153
VI.10. Stabilité de la curcumine immobilisée à pH.....	155
VI.11. Cinétique de libération de la curcumine <i>in vitro</i>	160
VI.12. Conclusion.....	163
Conclusion générale et perspectives.....	164
Références bibliographiques.....	168

Liste des abréviations et des symboles

AA : Acides aminés
A : Absorbance
A• : Radical antioxydant
ABS : Solutions tampons acétate
AH : Antioxydant phénolique
Ah : Acide hyaluronique.
ATG : Analyses thermogravimétriques.
CD : Cyclodextrine
CMC : Carboxyméthylcellulose.
CMCO : Carboxyméthylcellulose oxydée
CN : Caséine
CN-k : Caséine kappa
C : Concentration
COX-2 : Cyclooxygénase 2
CS : Chitosane.
CUR : Curcumine
DDA : Degré de désacétylation (%)
DCMC : Dialdéhyde de carboxyméthylcellulose
DMF : *N,N*-Diméthylformamide.
DMSO : Diméthylsulfoxyde.
DPPH: 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl.
DP : Degré de polymérisation.
DS : Degré de substitution.
E : Vitamine E
Ei : Efficacité en immobilisation (%)
FTIR : Spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier
GA : Glutaraldéhyde
GAG : Glycosaminoglycanes
G' : Composante élastique en cisaillement
G'' : Composante visqueuse en cisaillement
IC₅₀ : Concentration inhibitrice de 50 %
iNOS : Oxyde nitrique synthase
K : Constant pour un système solvant/soluté donné.
k_v: Constante de vitesse de libération
M : Poids moléculaire moyen (g.mole⁻¹)
MCA : Acide monochloroacétique
mcf : Masse de curcumine encapsulée dans les films.
MEB : Microscopie électronique à balayage
mi : Quantité de curcumine initiale (la masse totale)
ms : Quantité de curcumine dans le surnageant (la masse filtré)
M0: Masse initiale du film
Mt: Masse du film gonflé dans le solvant

Mt/M ∞ : Fraction du principe actif libéré au temps t .
Mr : La quantité de curcumine libérée dans le récepteur.
Ms : La quantité de curcumine trouvée dans la membrane de peau.
n : Exposant indiquant le mécanisme de la libération.
Na: le nombre de moles de groupements amines libres du chitosane au moment t , après la réticulation.
Nb: le nombre de moles de groupements amines initiales libres du chitosane avant la réticulation
NHS : N-hydroxysuccinimide.
P : La perméabilité de la curcumine des films analysés
PBS : Solutions tampons phosphate
PM : Poids moléculaire
Q $_t$: Degré de gonflement (%)
R : Rapport molaire
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.
s : Substance oxydée
S : la surface du film
T : Température
t : Temps de libération
t $_{1/2}$: Temps de demi-réaction
TEMPO : Ion oxoammonium 2,2,6,6-tétraméthyl-1-pipéridine.
TPP : Tripolyphosphate de sodium
UV : Ultra-violet
X• : un radical

Caractères :

α : Constant pour un système solvant/soluté donné.
 α -La : alpha-lactalbumine
 β -CD : β -cyclodextrine
 β (1-42) : peptide amyloïde
[η] : viscosité intrinsèque
 λ_{max} : longueur d'onde maximale (nm)

Unités :

C° : Degré Celsius
g : Gramme
mol : Mole
g/mol : gramme par mole
KDa : kilodalton
nm : Nanomètre
Å° : Angström
min : Minute
h : heure

Liste des figures

Figure I.1	Formules chimiques de l'amidon, du chitosane et de la cellulose, n indique le degré de polymérisation, les atomes de carbone des unités glucosidiques de la cellulose sont numérotés de 1 à 6.	7
Figure I.2	D-glucose en forme linéaire et deux formes cycliques possibles : anomère α -D-glucopyranose (en haut) et β -D-glucopyranose (en bas).	8
Figure I.3	Comparaison des structures de la chitine (a) et du chitosane (b).	10
Figure I.4	Procédée de la fabrication de chitine et chitosane.	11
Figure I.5	Structure chimique de la carboxyméthylcellulose de sodium.	17
Figure I.6	Exemple de polypeptide.	18
Figure I.7	Structure primaire de l' α -lactalbumine (A). Les acides aminés colorés en rouge et en bleu correspondent aux acides aminés acides.	20
Figure I.8	Représentation des structures tridimensionnelle de la α -, β - et κ -CN.	21
Figure I.9	Carboxyméthylcellulose sodique obtenue par la réaction de Williamson.	23
Figure I.10	O-Carboxyméthylation du chitosane en position C6.	23
Figure I.11	N-carboxyméthylation du chitosane.	24
Figure I.12	Oxydation de la carboxyméthylcellulose par le NaIO_4 .	25
Figure I.13	Oxydation de l'alginate de sodium par le NaIO_4 .	25
Figure I.14	Oxydation de la cellulose par le peroxyde d'hydrogène.	26
Figure I.15	Oxydation du chitosane par NaClO_2 .	27
Figure I.16	Oxydation de l'alginate de sodium par le permanganate de potassium.	27
Figure II.1	Structure d'un réseau (transition sol – gel).	31
Figure II.2	Différents types d'hydrogels : (a) neutre, (b) anionique, (c) cationique et (d) avec des groupements pendants ioniques.	32
Figure II.3	Classification des hydrogels.	33
Figure II.4	Mécanisme de réticulation du chitosane par formation de liaisons chimiques avec un aldéhyde.	34

Figure II.5	Mécanismes de gélification physique in situ par (a.) interactions hydrophobes, (b.) interactions de charges, (c.) liaisons hydrogène, (d.) stéréocomplexation et (e.) assemblage supramoléculaire.	36
Figure II.6	Représentation des principales méthodes de synthèse des hydrogels chimiques: (a.) polymérisation radicalaire de monomères (ici monomères vinyliques), (b.) polymérisation radicalaire de polymères fonctionnalisés, (c.) réactions chimiques entre fonctions complémentaires, (d.) ajout d'un agent de réticulation (en vert) et (e.) irradiation.	37
Figure III.1	(A) Rhizome et poudre de curcuma, (B) Curcuma longa et (C) structure chimique développée de la curcumine.	48
Figure III.2	Structure de la curcumine.	49
Figure III.3	Les différentes voies de dégradation de la curcumine : (a) réduction (b) conjugaison (c) oxydation (d) clivage.	50
Figure III.4	Mode d'Action des Curcuminoides.	56
Figure III.5	Les structures des trois familles principales de cyclodextrines classées selon le nombre d'unités de glucose présentes : α -, β - γ - CDs (avec 6, 7, 8 unités de glucose respectivement).	57
Figure III.6	Représentation schématisée de l'association d'une cyclodextrine libre (CD) avec une molécule (médicament) pour former un complexe molécule-cyclodextrine (1:2) (complexe médicament-CD).	58
Figure III.7	Cinétiques de libération d'ordre 0 (a) et d'ordre 1 (b) après administration orale d'une forme à libération prolongée.	60
Figure IV.1	Image du procédé d'oxydation du périodate, avec et sans couverture de papier d'aluminium.	63
Figure IV.2	Méthode expérimentale utilisée pour l'obtention du complexe d'inclusion de la curcumine avec le cyclodextrine à un rapport 2 : 1.	66
Figure IV.3	Méthode expérimentale de préparation des films hydrogels à base de CS et LA réticulés avec la CMCOx chargés par le complexe d'inclusion.	70
Figure IV.4	Appareil du spectrophotomètre infrarouge à transformée de fourrier de type Bruker Vertex FT-IR.	71
Figure IV.5	Appareil du spectrophotomètre RMN (Bruker NEO 1-400).	72

Figure IV.6	Appareil du spectrophotomètre UV-visible – NanoDrop ND-1000.	72
Figure IV.7	Courbe d'étalonnage $A = f(C)$ de la solution aqueuse de lactalbumine.	74
Figure IV.8	Courbe d'étalonnage $A = f(C)$ de la solution aqueuse du chitosane.	76
Figure IV.9	Appareil de la microscopie électronique à balayage (MEB).	77
Figure IV.10	Appareil d'analyse thermogravimétrique de type TGA Instrument Q500.	78
Figure IV.11	Courbe d'étalonnage $A = f(C)$ de la solution aqueuse de la curcumine dans l'éthanol à 425 nm.	81
Figure IV.12	Etude de cinétique de la perméabilité transdermique in vitro par cellule de diffusion verticale de Franz.	83
Figure IV.13	Courbes d'étalonnage du curcumine dans la solution PBS de pH=7.4 (a), et solution ABS de pH=5.5 (b).	83
Figure IV.14	Courbes d'étalonnage du curcumine dans une solution tampon phosphate pH 7,4 (a) et dans ABS pH 5,5 (b). Les solutions tampons contiennent 1% de Tween80.	85
Figure V.1	Spectres FT-IR de la CMC et de la CMCOx (le temps utilisé pour la réaction d'oxydation était 6 heures).	93
Figure V.2	Les spectres ^1H RMN pour CMC dissous dans l'eau, CMCOx dissous dans l'eau et CMCOx dissous dans DMSO.	95
Figure V.3	Les spectres ^{13}C RMN pour CMC dissous dans l'eau, CMCOx dissous dans l'eau et CMCOx dissous dans DMSO.	95
Figure V.4	Représentation schématique de la réaction d'oxydation de CMC par le periodate de sodium (NaIO_4).	97
Figure V.5	Première étape du mécanisme d'oxydation de l'alcool pinacolique par le periodate de sodium.	98
Figure V.6	Mécanisme concerté de l'intermédiaire réactionnel cyclique à 5 chaînons.	98
Figure V.7	La variation de la quantité du periodate (NaIO_4) en fonction du temps.	99
Figure V.8	Variation dans le temps du degré d'oxydation de la CMC.	100
Figure V.9	Variation du poids moléculaire de la CMC avec la durée du processus d'oxydation.	101

Figure V.10	Variation du rendement d'obtention des films en fonction du rapport molaire $-\text{CH}=\text{O}/-\text{NH}_2$ ($t_{\text{reaction}} = 2.5 \text{ h}$; $T_{\text{reaction}}=55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 2,4$).	104
Figure V.11	Présentation schématique de la structure des films d'hydrogel à base de CS/CMCOx.	105
Figure V.12	Réaction de réticulation covalente du chitosane avec la CMCOx.	105
Figure V.13	Mécanisme de la réaction avec la ninhydrine.	106
Figure V.14	Evolution pendant le temps du nombre de moles des groupements amines réagissant pour le mélange CMCOx/CS (film P2, R (0.375/1), ($T_{\text{reaction}}=55^{\circ}\text{C}$).	107
Figure V.15	Variation du degré de conversion DC_{amine} avec le rapport molaire $-\text{CH}=\text{O}/-\text{NH}_2$ des hydrogels à base de CS réticulé avec la CMCOx ($t_{\text{reaction}} = 2.5 \text{ h}$; $T_{\text{reaction}}=55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=2.4$).	109
Figure V.16	Influence de temps sur le DC_{amine} (rapport molaire $-\text{CH}=\text{O}/-\text{NH}_2 = 0,375/1$, $T=55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=2.4$).	112
Figure V.17	Influence de la température sur le DC_{amine} (rapport molaire $-\text{CH}=\text{O}/-\text{NH}_2 = 0,375/1$, $t_{\text{réaction}} = 2,5 \text{ h}$, $T_{\text{réaction}}=55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=2.4$).	114
Figure V.18	Spectres infrarouge du chitosane, de la Carboxyméthylcellulose oxydée et de film P2 (CMCOx/CS) avec un rapport molaire ($-\text{CH}=\text{O}/-\text{NH}_2 = 0,375/1$).	115
Figure V.19	Photographies MEB pour les échantillons P1 et P3.	118
Figure V.20	Courbes thermogravimétriques pour les échantillons CS, CMCOx, les films (P2 et P3).	120
Figure V.21	Les courbes de contrainte à la rupture en fonction de la déformation des différents films hydrogels préparé à base du chitosane réticulé par la CMCOx.	122
Figure V.22	La variation avec le temps du degré de gonflement pour les films de type P2 obtenus à différentes températures de réticulation (temps de réticulation = 3 h) dans une solution ABS, $\text{pH} = 5,5$ (a) et dans PBS à $\text{pH} = 7,4$ (b).	124
Figure V.23	Variation avec le temps du degré de gonflement pour les films de type P2 obtenus à différents temps de réticulation dans deux milieux différents: a) $\text{pH} = 5,5$ et b) $\text{pH} = 7,4$. ($T_{\text{réaction}} = 55^{\circ}\text{C}$).	127

Figure V.24	La variation avec le temps du degré de gonflement en fonction de différents rapports molaires des hydrogels obtenus P1, P2 et P3 dans deux solutions de pH différents: a) pH = 5,5 et b) pH = 7,4 , (durée de réticulation = 3 h, $T_{\text{réaction}} = 55 \text{ }^{\circ}\text{C}$).	128
Figure V.25	Variation de l'efficacité d'inclusion de la curcumine dans les films de CS / CMCO _x obtenus en fonction du rapport molaire -CH=O/NH ₂ (mol/mol).	131
Figure V.26	Cinétique de libération de la curcumine avec le temps dans une solution ABS à pH = 5,5 exprimée en efficacité de libération (a), ou en termes de perméabilité ($\mu\text{g} / \text{cm}^2$) (b) et dans une solution PBS à pH = 7,4 exprimée en efficacité de libération (c) , ou en termes de perméabilité ($\mu\text{g} / \text{cm}^2$) (d), pour les échantillons P1C, P3C et P5C.	133
Figure V.27	Réaction de réduction du radical libre DPPH.	136
Figure V.28	Les valeurs obtenues d'IC50 pour les échantillons analysés.	138
Figure VI.1	Structure du complexe d'inclusion de (β -CD) et curcumine d'un rapport (2:1).	143
Figure VI.2	Courbe d'étalonnage de la lactalbumine par la méthode de ninhydrine.	145
Figure VI.3	Courbe d'étalonnage de la curcumine dans des solutions en éthanol à 425 nm.	145
Figure VI.4	L'efficacité de chargement (inclusion) de la curcumine dans les hydrogels à base de CS/LA/CMCO _x , pour différents rapports molaires -CH=O/NH ₂ ($t_{\text{réaction}} = 2.5 \text{ h}$; $T_{\text{réaction}} = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$).	146
Figure VI.5	Variation du DC _{amine} (%) des hydrogels à base de CS et LA réticulé avec la CMCO _x en fonction de différents rapports molaires - CH=O/ -NH ₂ , ($T_{\text{réaction}} = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$).	147
Figure VI.6	Degré de conversion DC _{amine} (%) des hydrogels à base de CS et LA réticulés avec la CMCO _x , chargé du complexe de la curcumine avec le β -cyclodextrine en fonction de différents rapports molaires - CH=O/ -NH ₂ , ($T_{\text{réaction}} = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$).	148
Figure VI.7	Aspect des films à base de CS et LA réticulés avec CMCO _x . Le film P3 (partie droite) et le film P1 (partie gauche).	149

Figure VI.8	Variation du degré de gonflement en fonction du temps pour les échantillons P1, P2 et P3 à base de CS/LA/CMCOx (temps de réticulation de 3h, $T_{\text{reaction}}=30^{\circ}\text{C}$) dans: (a) PBS à pH = 7,4; (b) ABS à pH = 5,5.	150
Figure VI.9	Aspect des films à base de CS/LA/CMCOx contenant le complexe d'inclusion de la curcumine : film P1 (gauche) et film P3 (droite).	151
Figure VI.10	Variation du degré de gonflement en fonction du temps pour les films P1 (C), P2 (C) et P3 (C) (temps de réticulation de 3h, $T_{\text{reaction}}=30^{\circ}\text{C}$) dans: (a) PBS à pH = 7,4 (b) ABS à pH = 5,5.	152
Figure VI.11	Variation pendant le temps du pourcentage de la curcumine non dégradée (%) pour une période de 30 jours d'exposition à l'air et à la lumière naturelle [curcumine libre, hydrogels P1(C), P2(C), P3(C)].	154
Figure VI.12	Le pourcentage de la curcumine non dégradée pour quelques durées d'exposition de la curcumine libre en solution, à des valeurs différentes du pH.	156
Figure VI.13	Variation pendant le temps du pourcentage de la curcumine non-dégradée provenant de la curcumine libre soumise à dégradation, à différentes valeurs du pH.	157
Figure VI.14	Variation pendant le temps du pourcentage de la curcumine non-dégradée provenant du complexe de la curcumine dans le cyclodextrine, à différentes valeurs du pH [échantillon P1(C)].	158
Figure VI.15	Le pourcentage de la curcumine non-dégradée pour quelques durées d'exposition de l'échantillon P3(C) dans des solutions à différentes valeurs du pH.	159
Figure VI.16	Variation pendant le temps du pourcentage de la curcumine non-dégradée provenant du complexe de la curcumine dans le cyclodextrine, à différentes valeurs du pH [échantillon P3(C)].	160
Figure VI.17	La cinétique de libération de la curcumine pour les 3 films biopolymères: (a) P1(C), P2(C), P3(C) à pH = 7,4; (b) P1(C), P2(C), P3(C) à pH = 5.5.	161

Liste des tableaux

Tableau I.1	Quelques applications du chitosane.	16
Tableau I.2	Principales caractéristiques de l' α -lactalbumine.	20
Tableau I.3	Structures secondaires de l' α -lactalbumine, à partir de la structure cristallographique 1F6S.	20
Tableau II.1	Critères de fabrication pour des hydrogels utilisés en relargage contrôlé.	46
Tableau III.1	Les structures de la curcumine, de ces analogues et des principaux dérivés de l'auto-oxydation.	51
Tableau IV.1	Dosage des protéines totales de lactalbumine.	74
Tableau IV.2	Dosage des groupements amines libres des protéines et des polysaccharides.	75
Tableau V.1	Protocole expérimental utilisé pour obtenir des films hydrogels réticulés de manière covalente à base de CS et CMCOx.	103
Tableau V.2	Les valeurs de DC_{amine} (%) pour les hydrogels obtenus par réticulation chimiques et l'interaction physique entre le CS et CMCOx, respectivement, par l'interaction des groupements amines de CS avec les groupements carboxyliques de CMC.	110
Tableau V.3	Variations des caractéristiques mécaniques (Valeurs moyennes) des différents films hydrogels sec à base de CMCO/ CS en différents rapports molaires : P1 (0,25/1), P2 (0,375/1), P3 (0,5/1) et P4 (0.75/1).	123
Tableau V.4	L'efficacité de libération et la perméabilité de la curcumine chargée (encapsulée) dans les films hydrogels à travers la membrane de peau.	132
Tableau V.5	L'activité antioxydante exprimée par IC_{50} pour les échantillons analysés.	137
Tableau VI.1	Plan expérimental utilisé pour l'obtention des films à base de CS/LA réticulés avec CMCOx, sans et avec le complexe curcumine/ β -cyclodextrine immobilisé.	144
Tableau VI.2	Résultats concernant la dégradation de la curcumine libre et immobilisée à la lumière (exposition à la lumière naturelle et à l'air libre pendant 30 jours), évaluée par le pourcentage de curcumine restée non-dégradée.	154
Tableau VI.3	Les valeurs du facteur exponentiel n autorisé.	163

Introduction

générale

Introduction générale

La dermatologie est un domaine médical en constante évolution qui traite des maladies de la peau, des ongles, des cheveux et des maladies systémiques, en particulier celles dont les symptômes peuvent être observés principalement sur la peau. Les maladies cutanées les plus courantes signalées au cours de la vie d'un patient étaient les verrues, l'acné et la dermatite de contact, suivies par d'autres formes d'eczéma. Les traitements réalisés visent à améliorer l'aspect extérieur de la peau en traitant diverses maladies. Bien que l'incidence des maladies de la peau soit inférieure à celle des autres maladies, elles ont un impact significatif sur la qualité de vie, et le cancer de la peau ou les infections graves qui mettent la vie en danger [1].

Un hydrogel est un groupe de matériaux avec de nombreuses applications biomédicales utilisées en dermatologie. Un hydrogel est une matrice polymérique, hydrophile, à une structure tridimensionnelle capable d'absorber une grande quantité d'eau ou de fluides biologiques. L'un des principaux avantages des hydrogels utilisés dans le traitement local des maladies de la peau est leur facilité d'application et la possibilité de réduire les effets secondaires des médicaments immobilisés. Lors de l'administration topique (cutanée), le médicament pénètre d'abord dans la couche cornée, puis plus profond dans l'épiderme jusqu'à ce qu'il atteigne le derme, ensuite il est absorbé dans la circulation systémique par microcirculation cutanée [2].

L'administration locale du médicament dépend de nombreux facteurs, y compris les propriétés de barrière cutanée, les propriétés physico-chimiques du composé thérapeutique incorporé et le système d'administration utilisé. En raison de la propriété des hydrogels d'absorber de grandes quantités d'eau, ces biomatériaux ont été initialement conçus comme des systèmes d'administration de médicaments hydrophiles. Des recherches sont actuellement menées sur le développement de nouvelles matrices polymères capables d'incorporer des médicaments hydrophobes pour traiter un large éventail de maladies dermatologiques [3]. Les interactions médicamenteuses avec le système d'administration et la libération contrôlée et prolongée des médicaments immobilisés à travers la peau sont essentielles pour l'efficacité des médicaments dans les applications topiques. Ce type d'application de substance médicamenteuse permet d'obtenir une concentration thérapeutique dans les différentes couches de la peau situées dans la zone d'application. Dans le même temps, la concentration sérique est faible, ce qui entraîne une diminution des effets secondaires du médicament [4, 5].

Des polymères synthétiques et naturels sont utilisés pour obtenir des biomatériaux à

base d'hydrogels aux propriétés mécaniques et thérapeutiques améliorées. Les polymères naturels (polysaccharides et protéines) ont suscité beaucoup d'intérêt en raison de leur utilisation comme précurseurs pour l'obtention des hydrogels avec de nombreuses applications potentielles. Les polysaccharides sont les plus souvent utilisés en raison de leurs propriétés de biocompatibilité, biodégradabilité, la non toxicité, les similitudes de leurs propriétés physiques avec les tissus naturels, et leurs groupes fonctionnels pourraient être modifiés. Toutes ces propriétés font des certains composés macromoléculaires des candidats idéaux à l'élaboration et la conception des matrices ou des systèmes complexes pour l'inclusion et la libération contrôlée des médicaments qui nécessite l'utilisation de précurseurs avec des propriétés favorables au contact avec le tissu humain. Une caractéristique essentielle des hydrogels à base de polymères naturels est leur faible immunogénicité [6], ce qui lui permet d'être utilisé dans des applications biomédicales et pharmaceutiques [1,7]. En général, les objectifs de libération contrôlée sont les suivants: protéger le médicament contre la dégradation, augmenter la demi-vie et la biodisponibilité de certains médicaments, améliorer les effets thérapeutiques, réduire les effets secondaires du médicament ainsi que de réduire le coût de la recherche pour identifier une nouvelle cible moléculaire thérapeutique [8].

Les polysaccharides offrent une large gamme de fonctionnalités polyvalentes et une diversité structurelle en raison de leur poids moléculaire variable et de nombreux groupes fonctionnels (amine, carboxyle, carbonyle et hydroxyle) sur la chaîne principale [9]. Ces groupes hydrophiles déterminent une solubilité accrue dans l'eau et renforcent leurs caractéristiques de bioadhésivité. Par exemple, le chitosane (CS) est un polyelectrolyte, le seul polysaccharide avec une charge positive (polycation), qui lui permet d'être attaché à des couches muqueuses chargées négativement par des interactions électrostatiques [10]. Le chitosane (CS), un polysaccharide cationique naturel composé d'unités glucosamine et N-acétylglucosamine liées par des liaisons β (1-4) glycosidiques, est obtenu par le procédé de désacétylation alcaline de la chitine [11,12]. L'apport de propriétés physicochimiques très favorables, de sa biocompatibilité, sa biodégradabilité, sa faible toxicité, et sa mucoadhésivité [13,14], ce qui fait ce polysaccharide et bien connu pour un candidat privilégié pour l'encapsulation de molécules bioactives. Le CS a des propriétés réactives et peut être facilement fonctionnalisé grâce aux groupes hydroxyle et amine trouvés en grand nombre le long de sa chaîne et permet la réaction avec différents agents de réticulation. Les aldéhydes sont des agents de réticulation chimiques couramment utilisés pour préparer des hydrogels à base de CS. Des macromolécules contenant des aldéhydes peuvent être formées une liaison imine avec les groupes amines dans le CS pour donner un hydrogel biocompatible.

Les aldéhydes sont des agents de réticulation chimiques couramment utilisés pour préparer des hydrogels à base de CS. Des macromolécules contenant des aldéhydes peuvent former une liaison imine avec les groupes amines dans le CS pour donner un hydrogel biocompatible. Par exemple, le poly(éthylène glycol) dialdéhyde a été utilisé pour obtenir un hydrogel de CS avec une structure poreuse [15] et il a été démontré qu'il améliore les propriétés mécaniques de la matrice polymère lorsque la concentration d'agent de réticulation augmente [16,17]. Ainsi, bien que l'aldéhyde glutarique agit comme un agent réticulant [18], mais qui provoque souvent des cytotoxicités neurologiques [19]. Dans le but d'éliminer et éviter cette toxicité, nous avons orienté nos recherches vers la conception de supports naturels à base de polysaccharides (carboxyméthylcellulose (CMC) et le chitosane (CS)) en but de remplacer les agents de réticulation à petites molécules pour éviter leur toxicité [20]. La CMC est un dérivé de la cellulose, il est produit au niveau industriel à un prix réduit. De ce fait, c'est un polymère déjà très utilisé pour des applications pharmaceutiques. L'hydrogel à base de CS et de CMC possède des caractéristiques propres de grand intérêt. On peut donc facilement moduler les paramètres structurels du gel par combinaison avec la CMC qui est un polyanionite en obtenant des complexes polyélectrolytiques. Les composés carbonylés naturels, y compris les polysaccharides partiellement oxydés, sont une alternative préférée comme agents de réticulation, cela augmente le domaine d'application des hydrogels obtenus [21].

L'originalité de cette recherche est de mener ces études sur un hydrogel particulier à base de chitosane réticulé avec la carboxyméthylcellulose oxydé (CMCOx). L'obtention de CMCOx se base sur la modification du CMC par oxydation avec l'obtention des groupements carbonyles. Par ailleurs, le chitosane peut être associé et connecté au CMCOx pour former de réseaux interpénétrés de CS/CMCOx par des liaisons strictement covalentes ; comme ça une gamme variée des hydrogels avec des propriétés importantes ont été obtenus par la variation du rapport molaire entre les groupements amines (-NH₂) du CS et les fonctions aldéhydes (-CH=O) de CMCOx afin qu'ils interagissent les uns avec les autres pour former des bases de Schiff (-C=N) entre les chaînes de deux polymères [22]. Nous avons choisi la CMCOx comme agent réticulant parce qu'il est biologiquement inerte, biocompatible et de faible toxicité et la réticulation est décrite d'une manière simple dans la littérature. Donc l'intérêt de ce travail est de concevoir des hydrogels permettant l'inclusion et la libération contrôlée des médicaments ; la curcumine a été choisie comme un type de principe actif en raison de ses propriétés thérapeutiques remarquables et de son fort caractère antioxydant [23,24].

L'objectif principal de cette thèse de doctorat intitulée "**Hydrogels à base de polysaccharides portant des médicaments et leurs applications dans le traitement de certaines affections de peaux**" constitue, évidemment, l'obtention de nouveaux systèmes d'hydrogels qui permettent un meilleur contrôle de la cinétique de libération du principe actif. La réalisation de cet objectif général suppose la résolution de trois sous-objectifs spécifiques :

1. Le premier de ces objectifs est basé sur la modification chimique qui représente l'oxydation de la carboxyméthylcellulose (CMC) par périodate de sodium. Les dérivés oxydés (CMCOx) ont été obtenus en convertissant les groupes 1,2-dihydroxyle du motif du polymère en groupes dialdéhyde en C2 et C3 sans réactions secondaires significatives, sous l'action de NaIO_4 . Dans cette partie, les techniques spectrales de FTIR et de RMN ont été utilisées pour identifier la structure du polysaccharide modifié. La réaction de titrage avec $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a été utilisée pour déterminer les teneurs en groupes aldéhydes ainsi que le degré d'oxydation du polysaccharide. Le poids moléculaire de la CMCOx a été déterminé par la méthode viscosimétrique. La CMCOx a été sélectionnée comme agent de réticulation pour former des hydrogels biocompatibles capables d'inclure et de contrôler et libérer les principes bioactifs immobilisés. Afin d'obtenir les hydrogels, la température de réaction, le rapport molaire entre CS et CMCOx (pratiquement, entre le nombre de moles de groupes $-\text{NH}_2$ et $-\text{CH} = \text{O}$), et le temps de réticulation sont des paramètres dont l'influence a été étudiée [25].

2. Le deuxième objectif consiste à l'obtention des films à caractère d'hydrogel réticulés de manière covalente à partir de CS et la CMCOx, chargés de curcumine. Ces films hydrogels élaborés ont été sélectionnés et caractérisés par les différentes techniques telles que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), la microscopie électronique à balayage (MEB), l'analyse thermogravimétrique (ATG) et la résistance mécanique...

Des différentes méthodes de caractérisation classiques permettent de définir entre les films d'hydrogel obtenus, ceux ayant une capacité importante de rétention d'eau, et une meilleure porosité pour l'encapsulation et la libération contrôlée du principe actif. La cinétique de libération et la perméabilité de la curcumine à partir des hydrogels obtenus ont été étudiées sur la peau de poulet utilisée comme membrane dans deux milieux de pH différents, à $\text{pH} = 5,5$ et $\text{pH} = 7,4$ à $37\text{ }^\circ\text{C}$ jusqu'à l'équilibre en utilisant une cellule de diffusion Franz. L'activité antioxydante, exprimée par IC_{50} , des films d'hydrogels avec ou sans curcumine encapsulée a été déterminée.

3. Le dernier objectif est de concevoir des hydrogels à base de CS/LA/CMCOx chargé par le complexe d'inclusion de curcumine/ β -cyclodextrine. Ce complexe a été réalisé afin

d'augmenter la solubilité de la curcumine et pour la rendre soluble même dans l'eau, ce qui aura pour effet l'augmentation de sa biodisponibilité. Les tests de stabilité de la curcumine immobilisée à la lumière et aux pH ont été examinés. Les hydrogels obtenus sont sensibles au pH et ont la capacité d'encapsuler et de libérer le principe actif. [25]

Ce manuscrit est divisé en deux sections : Dans la première, nous présentons une recherche bibliographique sur trois thèmes : Notions générales sur les polysaccharides, l'obtention des hydrogels et leurs utilisations dans la bioapplication, la curcumine et ses propriétés ainsi que les systèmes à libération contrôlée des principes actifs. La deuxième section est représentée par la partie expérimentale, constituée de trois chapitres et consacrée aux méthodes de travail (les protocoles de préparation des échantillons, la synthèse et la caractérisation des films hydrogels obtenus, l'étude de l'inclusion et la cinétique de la libération des principes actifs).

La thèse démarre par une **introduction générale** qui est destinée à décrire et exposer le problème considéré, donner une idée sur son importance et préciser l'objectif de cette étude. **Le premier chapitre** comporte deux parties : la première est basée à une étude bibliographique où nous nous attacherons à décrire des notions générales sur les polysaccharides et ses propriétés physico-chimiques ainsi que ses principales applications. La deuxième partie porte sur la connaissance de la modification chimique des polysaccharides en vue de leur transformation dans les dérivés hydrosolubles pour l'obtention des hydrogels utilisés ainsi qu'une étude de la description des différentes méthodes d'oxydation des polysaccharides surtout la méthode d'oxydation de CMC en présence du périodate de sodium. **Le second chapitre** sera consacré sur l'obtention des hydrogels sous forme de films, à base de polysaccharides et des protéines et leurs utilisations pour de bioapplications ainsi la description de différentes techniques de synthèse des films hydrogels. **Le troisième chapitre** représente un aperçu général sur la curcumine : structure, propriétés, activité biologique, avantages et désavantages. **Au quatrième chapitre**, nous avons exprimé les matériels utilisés et les protocoles expérimentaux, les méthodes opératoires suivies pour l'identification, la préparation ainsi la caractérisation et les études biologiques des matériaux élaborés. Nous présenterons les cinétiques des réactions d'oxydation ainsi que les différentes techniques physico-chimiques des films hydrogels obtenus. **Au cinquième et dernier chapitre**, nous avons analysé et discuté en illustrant les résultats expérimentaux obtenus.

Enfin, une **conclusion générale** récapitule les principaux résultats obtenus au cours de ce travail ainsi que des recommandations futures pour une éventuelle amélioration, notamment vis-à-vis d'une utilisation des films hydrogels à une plus grande échelle.

Partie

bibliographique

Chapitre I

I.1. Introduction

Les polymères naturels issus de ressources renouvelables de plantes, d'algues ou d'animaux sont des biopolymères. Ces polymères sont utilisés pour des applications médicales et incluent principalement deux catégories de molécules : les polysaccharides comme, le chitosane, l'alginate, la carboxyméthylcellulose, ou encore certains dérivés de la cellulose ainsi que des protéines telles que la lactalbumine, la caséine et la gélatine ect.....

Les polymères naturels suscitent ces dernières années un grand intérêt vu l'importance de leur utilisation dans des domaines d'applications diverses. Les mélanges de biopolymères de type protéine/protéine, protéine/polysaccharide, polysaccharide/polysaccharide et autres, aussi bien que leur modification structurale par des voies chimiques ou physiques permettent à l'aboutissement à de nouveaux biomatériaux dont les propriétés recherchées peuvent être optimisées.

Dans notre recherche bibliographique, nous nous proposons de faire un passage en revue de principales polysaccharides et protéines car ils représentent nos matrices polymériques étudiées pour préparer des films hydrogels dans le cadre de la réalisation de cette thèse de Doctorat. Dans cette présentation, nous ne décrivons que les principaux polymères ayant déjà fait l'objet d'études en tant que matériaux supports pour les médicaments, pour traitement de certaines affections de la peau.

I.2. Les polymères naturels (biopolymères)

Les polymères naturels sont des matériaux synthétisés par les êtres vivants : végétaux, animaux et microorganismes. Ces polymères sont utilisés pour des applications médicales et la famille la plus importante est celle des polysaccharides comme l'amidon, la cellulose, l'alginate ou le chitosane, certaines dérivés obtenues par la modification chimique des polysaccharides [26]. Une autre famille est constituée par les protéines qui sont issu des plantes oléagineuses (colza, tournesol, soja), des protéagineux (pois, fèves), du son des céréales (gluten du blé), de tissus animaux (collagène, gélatine) ou de produits animaux (lactalbumine, caséine ...etc).

I.3. Généralités sur les polysaccharides

Les polysaccharides sont des macromolécules complexes que l'on retrouve dans tous les règnes (végétal, animal et bactérien). La cellulose est le principal polysaccharide de structure des végétaux, c'est le matériel naturel le plus abondant et renouvelable [27].

Les polysaccharides sont des polymères naturels synthétisés par des organismes vivants. Ils entrent dans la composition de la plupart des cellules aussi bien animales et végétales que microbiennes. La cellulose, l'amidon ou le chitosane sont les polysaccharides les plus connus [28]. Leurs unités de base sont représentées sur la figure I.1.

L'utilisation des polysaccharides d'origine végétale est largement déployée dans l'industrie agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique, l'agriculture et, plus récemment, les biotechnologies [29]. Actuellement, les polysaccharides font l'objet de recherche et développements importants, différentes études étant consacrées à leur usage sous forme de films hydrogels. Une classification chimique permet de distinguer deux grands types de polysaccharides:

- les homopolysaccharides formés d'un seul type de monosaccharide;
- les hétéropolysaccharides constitués de plusieurs unités d'oses différents.

Les polysaccharides sont une forme de glucides appelés aussi sucres, glucanes ou polyosides ; ils sont formés par la condensation d'unités glucidiques [30]. Ils peuvent être utilisés comme des épaississants, stabilisants, filmogènes, agents de suspension, flocculants, gélifiants, agents d'aération, lubrifiants, liants, émulsifiants, agents de texture et de structuration.

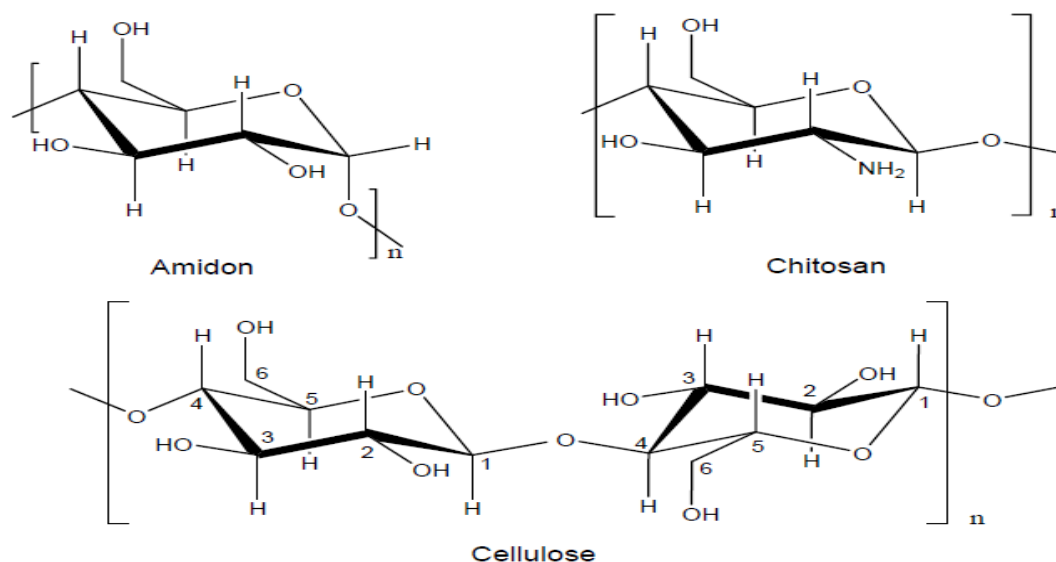


Figure I.1 : Formules chimiques de l'amidon, du chitosane et de la cellulose, n indique le degré de polymérisation, les atomes de carbone des unités glucosidiques de la cellulose sont numérotés de 1 à 6.

La chaîne moléculaire des polysaccharides est constituée de monomères glucides, appelés « oses », connus également sous nom de sucres. Les glucides sont des composés contenant entre 3 et 9 atomes de carbone, un groupement carbonyle (aldéhyde ou cétone) et plusieurs groupements hydroxyles.

Pour former une chaîne de polysaccharide, il faut que les oses qui comportent un groupement aldéhyde et plus de 4 atomes de carbone soient en forme cyclique et non pas linéaire. La formation d'un cycle est possible en milieu acide grâce au processus de tautomérisation entre l'aldéhyde et un alcool présent sur la même molécule. Cette réaction conduit encore une fois à deux isomères, dits anomères α et β , qui diffèrent par la position d'un groupement hydroxyle (situé au carbon1) par rapport au cycle (voir figure I.2).

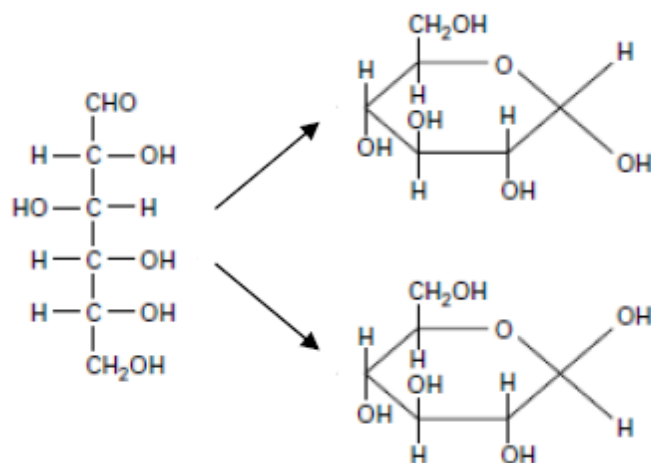


Figure I.2 : D-glucose en forme linéaire et deux formes cycliques possibles : anomère α -D-glucopyranose (en haut) et β -D-glucopyranose (en bas).

Parmi les polyélectrolytes, on retrouve principalement les polysaccharides cationiques (chargés positivement) sont beaucoup plus rares, citons le chitosane qui possède des fonctions amine facilement protonables mais qui est un polysaccharide artificiel obtenu après traitement (hydrolyse) de la chitine neutre et insoluble dans l'eau. Les polysaccharides anioniques (chargés négativement) portant sur leur squelette carboné des fonctions acide carboxylique tels que l'alginate ou l'acide hyaluronique mais aussi parfois des fonctions sulfates comme les carraghénanes. D'un point de vue structural, les polysaccharides peuvent être soit linéaires tels que le pullulane, le chitosane et l'acide hyaluronique, soit ramifiés tels que l'amylopectine, le dextrane et le xanthane [31].

I.4. Polysaccharides utilisés pour l'obtention des hydrogels pour bioapplication

Les hydrogels à base de polysaccharides ont capté de plus en plus l'intérêt des chercheurs durant la dernière décennie grâce à leurs propriétés intrinsèques en adéquation avec les applications médicales potentielles. Leur biocompatibilité, la capacité de libération des composés hydrosolubles et à moduler leurs propriétés physico-chimiques permettent la génération de nouveaux biomatériaux avec des applications dans le domaine de la libération contrôlée des médicaments. En général, les polymères utilisés sont hydrophiles et présentent des propriétés physico-chimiques intéressantes pour leur utilisation dans les applications biomédicales. Parmi eux, le chitosane (CS) et la carboxyméthylcellulose (CMC) seront traités ci-dessous, parce qu'ils représentent les matériaux utilisés dans le cadre de cette thèse; les méthodes d'obtention seront présentées, puis leurs propriétés et les applications dans lesquelles ils sont utilisés à présent.

I.4.1. Chitosane

I.4.1.1. Origine et structure

Le chitosane (CS) est un polysaccharide cationique naturel, obtenu dans l'industrie par désacétylation de la chitine [32], biopolymère extrait de l'exosquelette des crustacés, des mollusques, des insectes et de certaines familles de champignons [33]. Le chitosane est considéré comme appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (GAG), une sous-catégorie des polysaccharides, la seule qui offre de la bio-activité, aspect très important en ce qui concerne les applications biomédicales [34]. La chitine est un homopolymère composé de -(1,4) N-acétyl-D-glucosamine et le chitosane est un polymère composé de glucosamine et N-acétyl-glucosamine (figure I.3). Son immunogénicité est très réduite même si l'azote est présent dans la molécule [35].

Le chitosane présente un intérêt dans le domaine de la libération des médicaments à cause de leur excellente qualité de biocompatibilité, biodégradabilité et non toxicité [36]; on ajoute à ces propriétés son caractère antimicrobien.

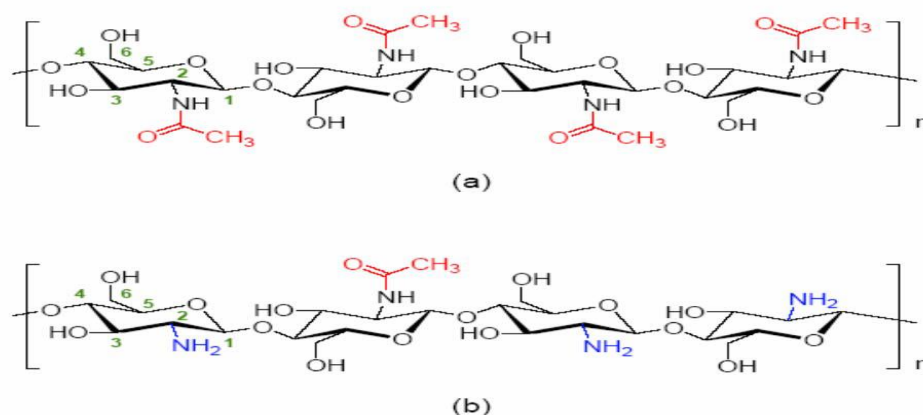


Figure I.3 : Comparaison des structures de la chitine (a) et du chitosane (b).

De nombreuses méthodes ont été développées afin de séparer la chitine à partir des exosquelettes. De manière générale, elles consistent à éliminer les éléments minéraux (déméralisation), les protéines (déprotéinisation) et la couleur (blanchiment) [37] (figure I.4). Le chitosane présente une capacité de fonctionnalisation très variée ce qui l'amène à être utilisé dans une grande gamme d'applications (libérations de gènes [35], libération contrôlée de médicaments [38], ingénierie tissulaire [39], des applications ophtalmiques ou des lentilles de contact [40], hygiène orale [41], agent anticoagulant [42], adjuvant anti tumoral [43]). Il peut être formulé comme microparticules, bandages, films ou éponges. Le choix du chitosane comme matériau de base n'est pas dû au hasard mais à la possibilité de contrôler ses propriétés biologiques et physicochimiques [40,44].

La teneur en unité glucosamine est caractérisée par le degré de désacétylation (DDA). En fonction de la source de laquelle le polymère a été obtenu et la méthode de préparation, la masse molaire du chitosane peut varier entre 300000 et 10^6 g.mol⁻¹, et DDA entre 30% et 95% [45]. La masse molaire et le degré d'acétylation sont aussi des facteurs déterminants des propriétés biologiques et physico-chimiques observées. A partir du moment où le degré de désacétylation dépasse 50%, le chitosane devient soluble dans des solutions aqueuses acides diluées (acide acétique, acide formique et acide lactique) [33].

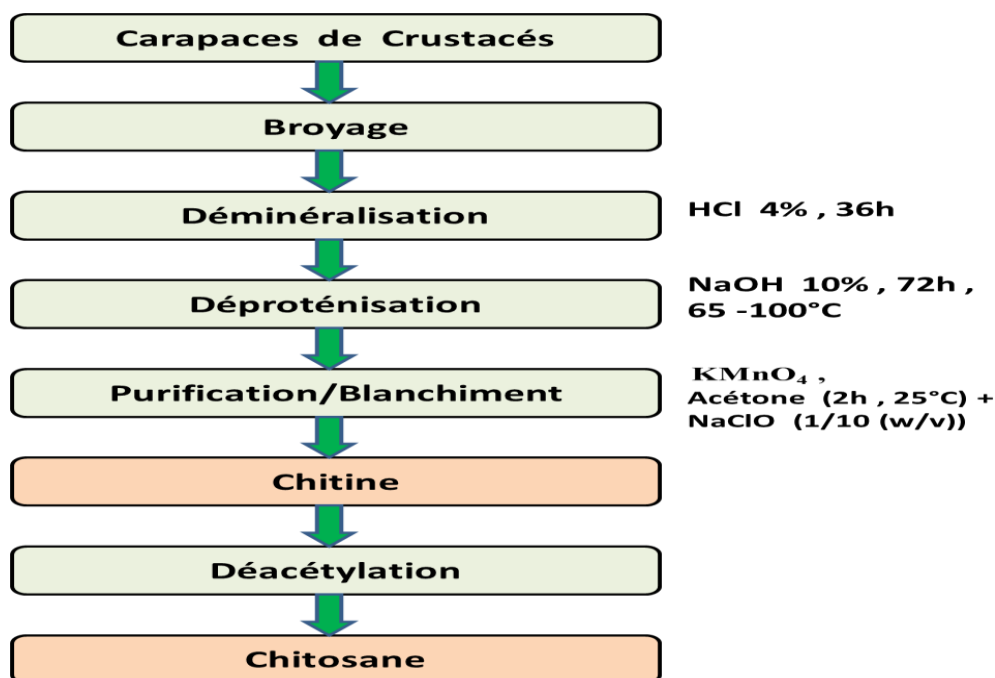


Figure I.4 : Procédé de la fabrication de chitine et chitosane [46, 47].

Le chitosane, base faible, est soluble dans des solutions diluées d'acide lorsque le pH est inférieur à 6 (car le pKa du groupement amine dans le chitosane est de l'ordre de 6,2), même s'il présente une structure cristalline et quelques interactions hydrogène [48]. En fonction de l'origine de la matière première et du type d'extraction, le chitosane présente une certaine cristallinité et du polymorphisme. La cristallinité est maximale pour la chitine (0% déacétylé) et le chitosane déacétylé complètement (100% déacétylé) [49].

Le chitosane présente trois groupes fonctionnels réactifs, c'est à dire un groupe amine primaire en position C-2, deux groupes hydroxyle dans les positions C-3, et C-6 respectivement [50, 51]. À cause de ces groupes fonctionnels le chitosane peut être facile à modifier en fonction des propriétés visées. Quelques réactions chimiques de modification du chitosane sont l'acylation, la désacétylation, l'alkylation, l'hydrolyse de la chaîne principale, la formation de bases de Schiff ou la copolymérisation par greffage.

I.4.1.2. La structure et propriétés du chitosane

Le chitosane peut être représenté par une structure chimique qui correspond à des séries de copolymères liés par des liaisons $\sim(1-4)$ où l'un ou l'autre des deux groupements -NH₂, -NH-, CO- et CH₃ est présent sur le carbone-2 de chaque unité glycosidique. Le chitosane est un polymère cationique avec des propriétés multifonctionnelles. Il est biocompatible [52], biodégradable et mucoadhésif. Il présente aussi des propriétés d'échange d'ions et antimicrobienne [53].

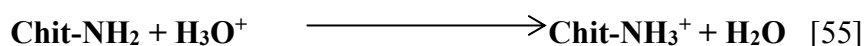
a) Viscosité

La viscosité est une caractéristique importante du chitosane concernant son comportement en solution. Cette caractéristique est liée à la conformation des chaînes macromoléculaires en solution. Plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amines libres, plus le chitosane est soluble. La viscosité du chitosane dépend également de plusieurs paramètres tels que : du degré d'acétylation de ce polymère, de la concentration du polymère (elle augmente avec la concentration), de la température, du poids moléculaire (la viscosité intrinsèque augmente en fonction de l'augmentation du poids moléculaire) [54] et enfin du pH (plus le pH est bas, plus la viscosité est élevée). Comme pour les autres polysaccharides, la viscosité chute lorsque la température augmente.

b) Solubilité

Le chitosane sous forme $-NH_2$ est insoluble dans l'eau, dans les acides concentrés, les bases et les solvants organiques. En effet, il est soluble dans les acides dilués grâce à la protonation de ses groupes amines. La solubilité du chitosane dépend de la valeur de degré d'acétylation (DDA), de la force ionique, du pH, de la nature de l'acide utilisé et de la distribution des groupes acétyles le long de la chaîne macromoléculaire. En général, un chitosane avec un DDA supérieur à 70 % présente une solubilité élevée.

Le chitosane se comporte comme un polyélectrolyte cationique de forte densité de charge en solution acide dilué.



$$K_a = \frac{[\text{Chit-NH}_3^+][\text{H}_2\text{O}]}{[\text{Chit-NH}_2][\text{H}_3\text{O}^+]}$$

Le pKa va également dépendre du degré d'acétylation (DDA) et de la masse moléculaire, mais en général il est autour de la valeur limite du pKa = 6,5 [56, 57]. Il dépend particulièrement au degré de neutralisation des groupes NH_3^+ . Dans un acide dilué (acide acétique, acide chlorhydrique, acide lactique, etc...), la protonation des groupements amines produit une destruction de la structure cristalline, un gonflement et une solubilisation du polymère. Plus le milieu est acide, plus les groupements amines sont protonés, donc cela favorise la solubilité de chitosane.

c) Cristallinité

La cristallinité est un paramètre important car elle contrôle un certain nombre de propriétés comme l'accessibilité des sites internes dans les chaînes macromoléculaires, les propriétés de gonflement dans l'eau ou encore les propriétés diffusionnelles.

La cristallinité est, en général, déterminée par des mesures de diffraction de rayons X. En fait, le chitosane est généralement une substance semi-cristalline [58].

d) Biodégradabilité

La biodégradation et la biorésorption du chitosane sont assurées par des enzymes qui l'hydrolysent en oligomères. Le chitosane peut être dégradé par les amylases des plantes, des champignons et de l'humain. Il est aussi sensible à l'action des lipases des animaux et des plantes. Chez l'homme et les mammifères, ce rôle est assumé principalement par des lysozymes qui dégradent les liaisons $\beta(1-4)$ glycosidiques des unités N-acétylglucosamine en des résidus N-acétylglucosamine et Dglucosamine, métabolisés ensuite dans l'organisme. Un chitosane de DD 50 % est ainsi facilement dégradé *in vivo* dans le sang et les tissus, sans accumulation dans le corps [58].

e) Biocompatibilité

La biocompatibilité d'un polymère est d'une importance fondamentale pour une utilisation thérapeutique. Le chitosane est biocompatible c'est-à-dire que sa présence dans un organisme entraîne des réactions inflammatoires et des réactions de rejet très limitées (propriétés immunologiques). Il est bio-résorbable avec des cinétiques faibles et contrôlées. La biocompatibilité du chitosane est caractérisée principalement par trois propriétés : sa non toxicité, sa cytocompatibilité et son hémocompatibilité [58].

La toxicité du chitosane en solutions de concentrations entre 0,003 et 0,025 % peut être considérablement diminuée suite à la fonctionnalisation du chitosane avec des groupements méthoxy-polyéthylène glycol [59]. La toxicité a été directement liée à la densité de charge et à l'arrangement spatial des résidus cationiques du chitosane.

f) Bioadhésion

Une des propriétés intéressantes du chitosane est sa mucoadhésivité conférée par sa capacité d'établir des liaisons ioniques ou des ponts d'hydrogène avec la mucine. La mucoadhésion permet une plus longue résidence des matrices à base de chitosane dans la région ciblée, et ensuite une meilleure stabilité et assimilation de la substance active. L'interaction du chitosane avec deux différents types de mucines, un obtenu des glandes submaxillaires des bovins a été étudiée dans l'eau distillée et dans l'acide chlorhydrique (0,1) M [60]. Cette interaction a été trouvée dépendante des ratios chitosane : mucine, du milieu d'hydratation et du type de la mucine, suggérant des différentes réactions équilibrées.

g) Activité antimicrobienne

Le chitosane présente une activité antimicrobienne face aux différents groupes de microorganismes, bactéries, virus, champignons, et levures [61, 62]. En général, les moisissures et les levures sont les plus sensibles au chitosane suivies des bactéries. Seule, la fraction soluble en milieu acide (pH 5,5) présente une capacité antimicrobienne, aux pH supérieurs, le biopolymère est insoluble, ce qui se traduit par une perte drastique de son efficacité [63].

L'activité antibactérienne du chitosane serait due essentiellement à la charge positive du chitosane qui interagit avec les phospholipides membranaires chargés négativement, ce qui crée une perturbation au niveau de la membrane avec une diminution des échanges de nutriments entre la bactérie et le milieu extérieur entraînant la mort cellulaire. Cette activité est influencée par de nombreux facteurs incluant l'origine biologique du chitosane, le pourcentage de désacétylation, le degré de polymérisation ou le poids moléculaire (PM).

I.4.1.3. Paramètres influençant les propriétés des films de chitosane

Pour les applications biomédicales, le chitosane est utilisé surtout sous forme de films et particules, les propriétés des films dépendent de plusieurs facteurs:

a) Masse moléculaire moyenne

La masse moléculaire moyenne de chitosane peut être déterminée par différentes techniques telles que la viscosimétrie [64], la chromatographie d'exclusion stérique [65] et la diffusion de la lumière. La séparation du chitosane des oligomères du chitosane peut être effectuée par électrodialyse [66].

Chen et Hwa.(1996) [65] ont étudié l'effet de masses molaires du chitosane (240 à 410 kg/mol) sur les propriétés mécaniques et barrières des films. Plus la masse molaire du chitosane augmente, plus la contrainte à la rupture augmente et inversement la perméabilité à la vapeur d'eau diminue. Ces résultats sont comparables à ceux de Sarasam et Madihally. (2005) [67] qui ont comparé trois différentes gammes de masses molaires du chitosane (50-190 kg/mol ; 190-310 kg/mol ; > 310 kg/mol).

La masse moléculaire moyenne du chitosane est caractérisée par viscosimétrie, il est nécessaire de connaître les paramètres K et α de la relation de Mark-Houwink et Sakurada (éq IV.2).

b) Degré de désacétylation

Le degré de désacétylation (DDA) d'acétylation est une des caractéristiques les plus importantes du chitosane. Il peut influencer les propriétés physiques, chimiques et biologiques du chitosane, telles que la solubilité, la cristallinité, la biodégradabilité et l'activité antimicrobienne [68]. Plusieurs méthodes ont été développées pour déterminer le degré de désacétylation DDA du chitosane. Ces méthodes sont classées en trois catégories:

- Méthodes spectroscopiques : spectroscopie IR, RMN_H, RMN_{C13}, RMN_{N15} et UV.
- Méthodes classiques : divers types de titrage, dosage pH métrique, conductométrie, potentiométrie...
- Méthodes destructives : analyse élémentaire, hydrolyse acide ou enzymatique de la chitosane et suivie de la mesure DDA par colorimétrie ou chromatographie liquide haute performance et analyse thermique par calorimétrie différentielle.

c) Nature de solvant

Le chitosane est soluble dans les milieux acides dilués par protonation des groupements amines. Les acides les plus fréquemment utilisés sont les acides acétique, formique, lactique, propionique et malique. Caner et al. (2006) [69] ont étudié l'effet de plusieurs acides sur les propriétés mécaniques et barrière du chitosane. Il a été démontré que l'acide acétique est le meilleur solvant pour obtenir des films de chitosane ayant de bonnes propriétés mécaniques et barrière.

Des résultats similaires ont été obtenus par Park et al. (2001) [70] pour l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide lactique et l'acide malique. Par contre, ils ont rapporté que l'élongation du film de chitosane obtenu d'une solution d'acide acétique est beaucoup plus faible, 4,1 % au lieu des 32,2% obtenus par Caner et al. (2006). Néanmoins, les films obtenus avec l'acide acétique possèdent les propriétés barrières à la vapeur d'eau et la contrainte à la rupture les plus performantes. Ainsi, l'acide acétique est utilisé comme le solvant du chitosane dans la majorité des études [71].

I.4.1.4. Les applications actuelles du chitosane et de ses dérivés

Le chitosane est biocompatible, biodégradable et non toxique. Il trouve donc des applications dans plusieurs domaines (santé, agriculture, ...) en mettant à profit ses diverses propriétés spécifiques. Son utilisation dans les secteurs économiques comme les industries alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques ou agricoles [72], est représenté dans le tableau I.1. Sur le plan de la recherche, les hydrogels de chitosane sont néanmoins très étudiés pour

des applications dans le domaine pharmaceutique et biomédical, notamment pour la libération de molécules actives [73] en raison de sa biocompatibilité présumée.

Tableau I.1 : Quelques applications du chitosane (adapté de [74]):

Champs d'applications	Applications
Médecine	Accélération de la cicatrisation et guérison des blessures Systèmes polymère-médicament à libération contrôlée
Chirurgie plastique	Stimulation de la régénération des tissus
Ingénierie tissulaire	Reconstitution de la peau, régénération osseuse
Pharmacie	Matériel absorbable avec contrôle de libération de principes actifs, lentilles de contact Adjuvant de vaccination
Chirurgie dentaire	Implants dentaires
Dermatologie	Crèmes de soins et de traitement de l'acné
Traitement des eaux	Diminution de turbidité et des odeurs , bactéricides
Alimentaire	Agent de conservation, enrobage protecteur (fruits)
Agriculture	Libération de fertilisants et nutriments

Les multiples propriétés biologiques expliquent pourquoi le chitosane a été évalué, sous différentes formes (films, éponges, tubes, hydrogels et membranes), dans le cadre de diverses applications biomédicales et pharmaceutiques [75,76]. A titre d'exemple, il a ainsi été suggéré qu'il puisse favoriser la cicatrisation, notamment lorsqu'il est associé à du collagène [77]. La commercialisation du chitosane dans le domaine médical reste toutefois limitée à ses formes non modifiées et principalement pour des applications liées à ses propriétés hémostatiques [78] et bactériostatiques [79]. On retrouve ainsi ces dispositifs médicaux sous forme de granule, de film, d'éponge, de bande et de matériau non-tissé [76].

I.4.2. Carboxyméthyl cellulose (CMC)

I.4.2.1. Origine et structure

La carboxyméthylcellulose est un dérivé de la cellulose. Elle est aussi dénommée CMC, NaCMC, CMC sodique, gomme cellulosique ou sel de sodium de l'éther carboxyméthyle de cellulose. Sa formule chimique générale est la suivante: $C_6H_7O_2(OR_1)(OR_2)(OR_3)$ où R_1 , R_2 et R_3 peuvent être: H; $CH_2COO^- Na^+$ ou CH_2COOH .

La carboxyméthylcellulose sodique est intensivement utilisée dans l'industrie alimentaire car elle possède des capacités stabilisantes, épaississantes de contrôle de cristallisation. Elle est considérée comme étant le polysaccharide le plus couramment utilisé dans le domaine alimentaire en présence surtout de protéines et ceci pour assurer leur protection, plus particulièrement contre la dénaturation lors des différents processus de transformation des aliments [80].

La CMC contient des unités d'anhydroglucoses substitués. C'est un sel de sodium partiel d'un éther carboxyméthyle de cellulose. La CMC peut être obtenu à partir de souches naturelles de matières végétales fibreuses. Son poids moléculaire peut être évalué par la mesure de la viscosité, il est compris entre 17,000 et 300,000. Son degré de polymérisation va de 80 à 1500. La teneur en carboxyméthylcellulose doit au moins être de 99,5 % de la substance anhydre. C'est une poudre granuleuse ou fibreuse, blanche ou légèrement jaunâtre ou grisâtre, légèrement hygroscopique, inodore et insipide [81].

On obtient la carboxyméthylcellulose en traitant la cellulose en milieu alcalin afin de briser les liens hydrogènes responsables de l'union des chaînes de polymères, en commençant par les zones amorphes. Suite à ce traitement, du monochloroacétate est ajouté à la cellulose hydratée afin d'obtenir le dérivé CMC (figure I.5). Le pKa de la molécule obtenue se situe entre 3,4 et 4,2. Globalement, certains des groupements hydroxyles de la cellulose se sont trouvés substitués par des groupements carboxyméthyles. Le nombre de ces groupements carboxyméthyles par unité anhydroglucose est appelé le degré de substitution (DS).

La CMC de qualité alimentaire est d'un DS égal ou inférieur à 0,95 [80], d'une viscosité minimale de 25 cps lorsqu'il est en solution à 2% et à 25°C et d'une pureté minimale de 99,5% sur base sèche.

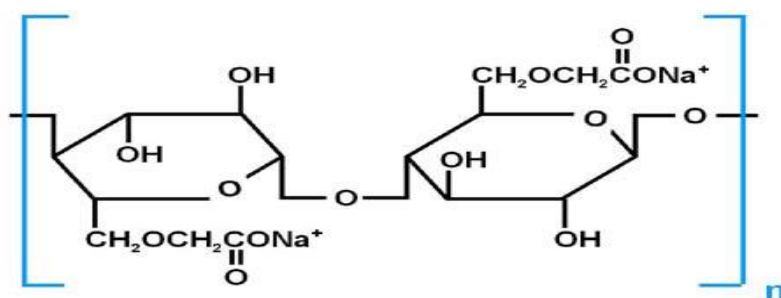


Figure I.5: Structure chimique de la carboxyméthylcellulose de sodium [80].

I.4.2.2. Propriétés fonctionnelles de la CMC

La CMC est utilisé principalement pour ses capacités stabilisantes, épaississantes de contrôle de cristallisation et de rétention d'eau [80]. Les desserts congelés, les produits de

boulangerie, les sauces à salade, les sirops, les boissons, les aliments extrudés et les aliments réduits en calories sont des exemples d'aliments comptant la CMC parmi leurs ingrédients [82]. Les propriétés fonctionnelles de ce polysaccharide anionique peuvent être modifiées en présence de protéines avec lesquelles il peut interagir.

I.5. Protéines utilisées pour l'obtention des hydrogels pour bioapplications

Ce sont des polymères organiques résultant de la condensation d'acides aminés par formation de liaisons peptidiques [83]. Les protéines ou polypeptides constituent une autre famille de polymères issus des végétaux et des animaux (gluten, caséine, collagène et gélatine...). La structure primaire des protéines consiste de l'enchaînement spécifique régulier de monomères d'un grand nombre d'acides aminés (AA), liés les uns aux autres par des liaisons peptidiques de type amide (-CO-NH) (figure.I.6).

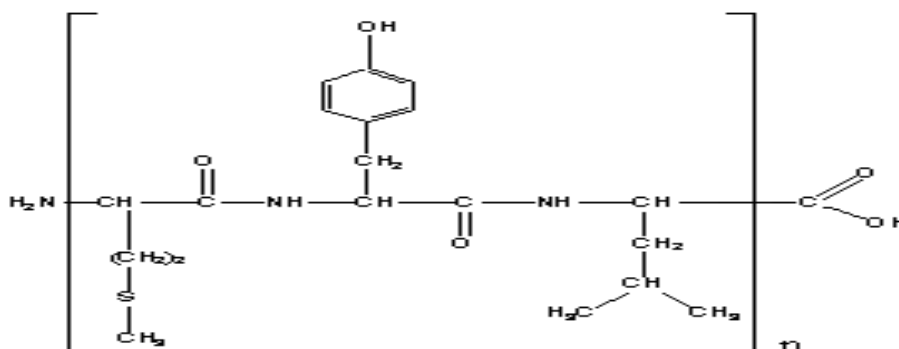


Figure I.6 : Exemple de polypeptide.

Deux acides aminés peuvent s'associer de façon covalente pour former un dipeptide. La liaison ainsi établie est la liaison peptidique, qui résulte de la combinaison entre le groupement carboxyle (COOH) d'un acide aminé et le groupement amine (NH₂) de l'autre, avec perte d'une molécule d'eau. La répétition de cette réaction n fois, permet ainsi d'obtenir un peptide (n < 100) ou une protéine (n > 100) [84].

La synthèse protéique est régie par le code génétique. Les protéines issues de végétaux (coton, soja, maïs et blé...) ont été utilisées pour la fabrication d'emballages et la réalisation de films plastiques [85, 86].

❖ Les protéines du lait

Le lait est constitué de deux fractions protéiques principales, une fraction soluble et une fraction colloïdale. La fraction soluble se compose des protéines lactosériques et la fraction colloïdale est formée par les caséines, ces fractions représentant 20% et 80% des protéines du lait des ruminants, respectivement. Les protéines lactosériques ou protéines du

lactosérum représentent la fraction protéique restant soluble lors d'une précipitation à pH 4,6 et à 20°C des protéines du lait écrémé d'origine bovine et à pH 4,2 et 20°C pour le lait équin [87]. Les protéines lactosériques se composent généralement de b-lactoglobuline, d' α -lactalbumine, d'immunoglobulines, de sérum albumine, de lactoferrine et de lysozyme.

I.5.1. α -Lactalbumine

L' α -lactalbumine (α -La) est une protéine globulaire compacte de la famille des métalloprotéines capable de se lier à plusieurs ions métalliques, principalement le calcium (Ca^{2+}), constitue l'une des deux sous-unités du complexe enzymatique lactose synthétase. Elle permet la synthèse du lactose dans la glande mammaire en modifiant la spécificité de substrat de l'UDP-galactosyltransférase et son affinité pour le glucose. L' α -lactalbumine humaine possède, quant à elle, un site secondaire de liaison au Ca^{2+} de plus faible affinité. Elle présente une forte similitude avec les protéines homologues des laits de vache, de chèvre et de femme. Sa séquence primaire est présentée sur la figure I.7.

La fixation du calcium joue un rôle important dans la stabilisation moléculaire de la structure spatiale de l' α -lactalbumine. L' α -lactalbumine peut aussi chélater d'autres cations tels que Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ et K^+ en plus de Ca^{2+} [88].

L' α -lactalbumine, une protéine importante et bien caractérisée du lait maternel, et représente 20 à 25 % des protéines totales du lait maternel [89]. Dans la mesure où elle constitue une source riche de nombreux acides aminés indispensables, une fraction de la protéine est fortement digérée, tandis que le reste produit des polypeptides qui exercent des activités antimicrobiennes, principalement contre les bactéries Gram positif, et non contre les bactéries Gram négatif [90].

a) La séquence primaire de l' α -lactalbumine

L' α -lactalbumine est une protéine globulaire de faible poids moléculaire constituée de 123 acides aminés. Elle contient un nombre conséquent d'acides aminés ionisables : environ 27 % pour l' α -LA (Figure I.7 et Tableau I.2). L' α -lactalbumine est une protéine acide avec un point isoélectrique (pI) de 4,8. L' α -LA possède 8 résidus cystéines qui forment quatre ponts disulfures intramoléculaires (Figure I.8 et Tableau I.2) [91].

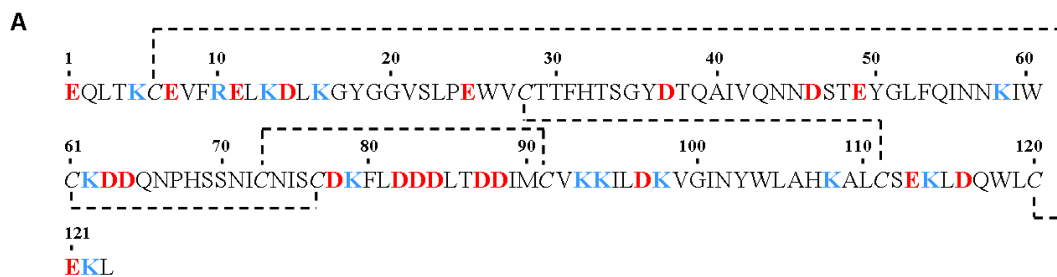


Figure I.7 : Structure primaire de l' α -lactalbumine (A). Les acides aminés colorés en rouge et en bleu correspondent aux acides aminés acides. Les pointillés représentent les ponts disulfures.

Tableau I.2 : Principales caractéristiques de l' α -lactalbumine [91].

Caractéristiques	α -lactalbumine
Nombre d'acides aminés	123
Poids moléculaire (Da)	14186
Rayon hydrodynamique (Å)	19
Point isoélectrique	4,8
Nombre de résidus cystéine	8
Nombre de ponts disulfures	4
Nombre d'acides aminés acides	20
Nombre d'acides aminés basiques	12

b) La structure secondaire de l' α -lactalbumine

L' α -lactalbumine présente des homologies structurales. Au niveau de sa structure secondaire, cette protéine est constituée majoritairement d'hélices α . Elle représente 44 % des structures secondaires de l' α -LA (tableau I.3).

Tableau I.3 : Structures secondaires de l' α -lactalbumine, à partir de la structure cristallographique 1F6S [92].

Structures secondaires	α -lactalbumine
Hélices α	44 % (54 acides aminés)
Feuillets β	11 % (14 acides aminés)

I.5.2. Caséine

Le mot vient du latin "Caseus" qui veut dire fromage. Les caséines (CN) sont les protéines majeures du lait des ruminants. Elles se définissent comme étant la fraction

protéique précipitant à pH 4,6 et à 20°C pour le lait écrémé bovin et à pH 4,2 et 20°C pour le lait équin [87]. La caséine est composée de différents fragments dans le lait au nombre de quatre: caséine α_{s1} , caséine α_{s2} , caséine b et caséine k. Ce sont des protéines multiphosphorylées, la dernière CN-k (K signifiant kappa) permet au lait de rester homogène et non pas décanté, ainsi pouvant être également glycosylée. Elle est riche en acides aminés et en phosphore. On l'appelle un composant azoté du lait. Elle est aussi utilisée dans la fabrication de la galalithe (plastique biodégradable), comme liant de peinture [93].

Dans le lait, les caséines sont organisées sous la forme de micelles et s'associent à un complexe minéral de phosphate de calcium [94].

1.5.2.1. Composition et propriétés du Caséine

Le lait est composé de particules colloïdales appelées micelles de CN qui sont composées d'un complexe de protéines associées et de phosphate de calcium [95]. Les CN, qui représentent 80% des protéines du lait bovin, sont la fraction protéique majeure de ce fluide laitier [96, 97]. Ces colloïdes d'association hétérogènes sont appelés micelles de CN. La micelle de CN est composée de quatre espèces différentes: l' α_{s1} -CN, l' α_{s2} -CN, la β -CN et la κ -CN. La micelle est également constituée de quelques fragments peptidiques (les caséines γ) issus de la protéolyse de la β -CN par la plasmine et de minéraux (7% du poids sec) dont 90% de phosphate de calcium.

Les trois sous-groupes de CN (figure I.8), comme la α -CN, la κ -CN et la β -CN, sont tous hétérogènes et se composent de 2 à 8 variantes génétiques. Les variantes génétiques d'une protéine ne diffèrent que par quelques acides aminés. Les trois sous-groupes ont en commun le fait que l'un des deux acides aminés contenant des groupes hydroxy est estérifié à l'acide phosphorique. L'acide phosphorique lie le calcium et le magnésium et certains des sels complexes pour former des liaisons inter et intramoléculaires qui stabilisent les micelles.

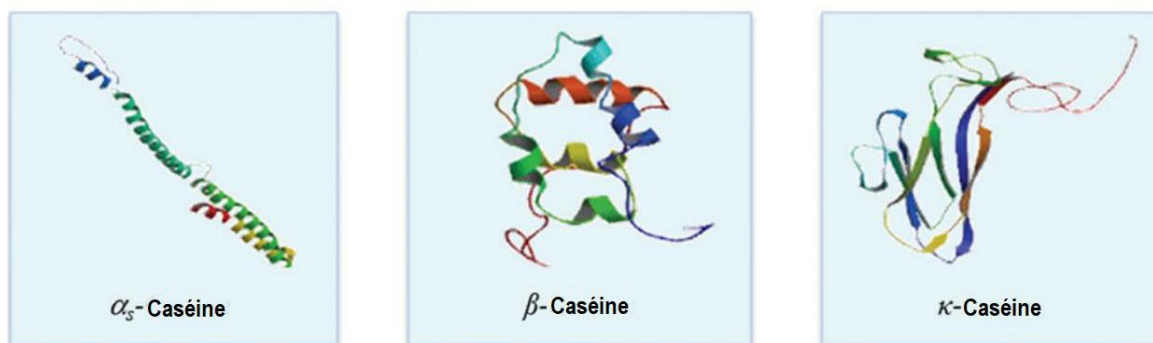


Figure I.8 : Représentation des structures tridimensionnelle de la α -CN, β -CN et κ -CN [98].

I.6. Modifications chimiques des polysaccharides en vue de leur transformation dans les dérivés hydrosolubles pour l'obtention des hydrogels

Les modifications chimiques des polysaccharides permettent d'aboutir à de nouvelles structures chimiques dans l'objectif d'améliorer les propriétés physico-chimiques et renforcer la bio-activité. Elles font appel à des méthodes communes de synthèse chimique. La détermination des structures s'avèrent par contre le plus souvent difficile à déterminer. Mais, des investigations de différents procédés ont été menées et établies par un grand nombre de chercheurs [99, 100]. Suite à cette complexité et à cette diversité des groupements fonctionnels existants sur l'ossature des polysaccharides, il est concevable que ces précurseurs sont des plaques tournantes pouvant selon les conditions opératoires utilisées à aboutir à de nouvelles et originales fonctions. Parmi les modifications chimiques les plus évoquées dans la littérature pour leur intérêt pratique et surtout dans le domaine du vivant, nous nous sommes intéressés à résumer les réactions suivantes que nous avons utilisés dans la thèse : la carboxyméthylation et l'oxydation.

I.6.1. Carboxyméthylation

Plusieurs dérivés des polysaccharides ont été préparés par des réactions de carboxyméthylation en utilisant comme des matières premières par exemple la cellulose [101], la chitine [102] et le chitosane [75] ect..... Les dérivés obtenus sont le plus souvent des polyélectrolytes pouvant être utilisés dans divers domaines d'application, dans les industries cosmétiques, pharmaceutiques [103], alimentaires et chimiques [104].

Les procédés permettant la production des agents carboxyméthylés ne sont pas coûteux et sont faciles à réaliser. Tous les réactifs utilisés sont abordables du point de vue prix et ne sont pas toxiques.

La carboxyméthylation des polysaccharides est basée sur la synthèse de Williamson où le alkoxyde (polysaccharidique dans un milieu basique) réagit avec de l'acide monochloroacétique (MCA) et les groupes hydroxyles primaires ou secondaires sont substitués par des groupes carboxyméthylés.

Le dérivé le plus important de cette série est la carboxyméthylcellulose (CMC). Il est largement utilisé dans les industries du textile, des papiers, comme épaississant dans l'alimentation et dans les formulations pharmaceutiques. Il est non toxique, biocompatible et biodégradable [105].

La CMC est obtenue en milieu basique à partir de la cellulose (figure I.9). Dans ces conditions les ponts hydrogène responsables de la cohésion des chaînes polymériques se décomposent en commençant par les zones amorphes [106]. Le pKa de la molécule obtenue se situe entre 3,4 et 4,2. Les degrés de substitution (DS) sont de l'ordre de 0,4 à 1,4 et ceux de polymérisation (DP) vont de 20 à 100.

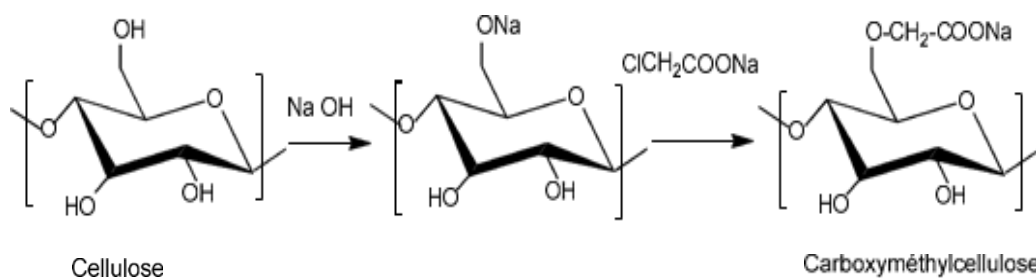


Figure I.9 : Carboxyméthylcellulose sodique obtenue par la réaction de Williamson [107].

Le chitosane est O-carboxyméthylé en position C3 et/ou C6 (figure I.10), ce qui augmente considérablement sa solubilité dans les solutions neutres ou alcalines. Il a été confirmé que le O-carboxyméthylchitosane améliore la biocompatibilité des surfaces des films d'acide polylactique ainsi que l'adhésion cellulaire et leur prolifération par rapport au matériau non modifié [75].

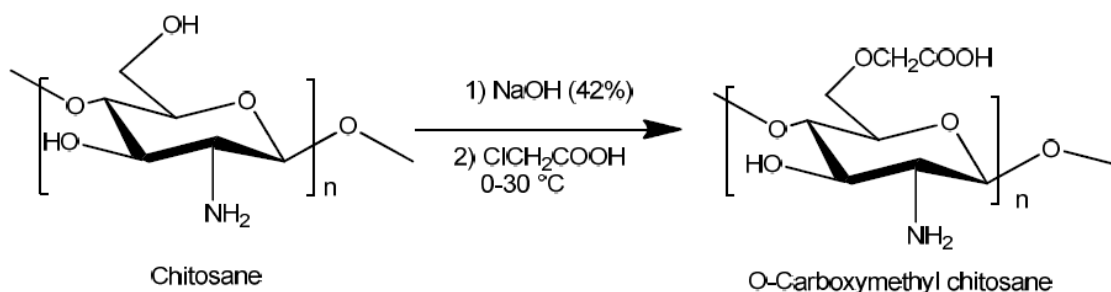


Figure I.10 : O-Carboxyméthylation du chitosane en position C6 [108].

Il y a aussi la N-carboxyméthylation du chitosane. Là, seuls les groupes amines du chitosane sont alkylés (figure I.11). Cette transformation se fait avec l'acide glyoxylique en milieu acide formant ainsi la base de Schiff qui est convertie ensuite en N-carboxyméthylchitosane par réduction au cyanoborohydrure de sodium (NaCNBH_3) [102].

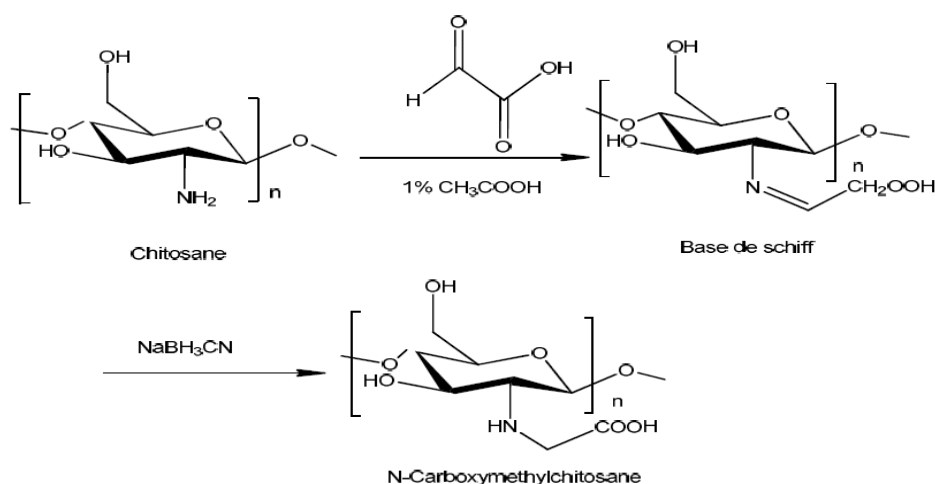


Figure I.11 : N-carboxyméthylation du chitosane [102].

I.6.2. Oxydation

La réaction d'oxydation conduit de manière sélective, ciblée, contrôlée ou aléatoire à des oligo et/ ou à des nouveaux polysaccharides oxydés dont leurs usages se diversifient et se sont intensifiés ces dernières décennies [109].

Différents procédés de modifications chimiques des polysaccharides ont été investigués par un grand nombre de chercheurs [110-111]. Parmi les principales fonctions réactives portées par les polysaccharides, en plus des fonctions alcools primaires, secondaires ou même tertiaires et des diols vicinaux, il existe une disparité de groupements tels que les carboxyles [112], les acétalamines [113], les amides [114], les méthylesters [115], les acétal [116], et autres qui sont susceptibles de réagir selon des voies de synthèse chimique appropriées et de donner de nouvelles matrices exploitées dans la vie quotidienne.

Parmi les réactions chimiques capables de modifier les polysaccharides, il y a l'oxydation par des agents possédant des capacités oxydantes, comme le NaIO_4 , KIO_4 , le KMnO_4 , le (2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxy ou TEMPO, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le chlorite de sodium NaClO_2 ,... et pouvant affecter les différents groupements fonctionnels y compris la structure du polysaccharide.

I.6.2.1. Oxydation par le periodate (NaIO_4)

L'oxydation par le periodate est largement utilisée comme une méthode pour l'élucidation des structures complexes en glucides et ses premières applications ont aidé à interpréter les structures fondamentales dans de nombreux polysaccharides tels que la cellulose, l'amidon et le glycogène [117,118]. L'ion periodate « IO_4^- » attaque les diols vicinaux pour cliver la liaison carbone-carbone par une réaction d'oxydation, conduisant à la formation d'un dialdéhyde [119].

La réaction de la carboxyméthylcellulose (C2-C3) avec le métaperiodate de sodium favorise la formation de groupes dialdéhydes, suite à une scission homolytique de la liaison C2-C3 [120]. La réaction d'oxydation est une réaction spécifique et clive la liaison C2-C3 uniquement pour former le dialdéhyde carboxyméthylcellulose (figure I.12). L'évaluation quantitative de degré d'oxydation, généralement sous-estimé en raison de la transformation de la carboxyméthylcellulose à des formes hydratées comme les hémiacétals.

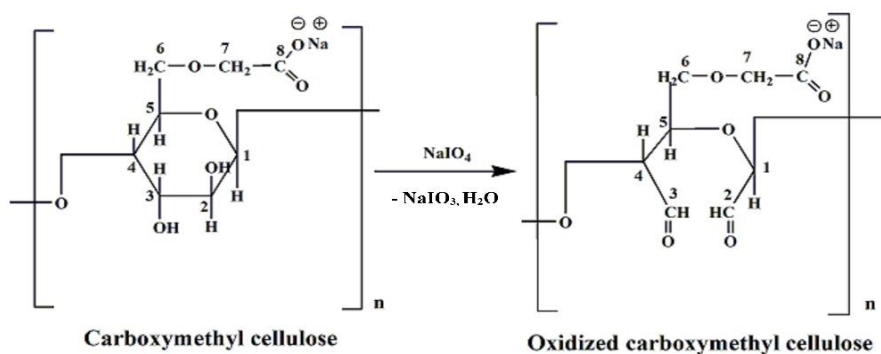


Figure I.12 : Oxydation de la carboxyméthylcellulose par le NaIO_4 [120].

La réaction de l'alginate avec le métaperiodate de sodium (figure I.13) active l'oxydation des deux groupes hydroxyles secondaires qui ont une faible réactivité en groupes aldéhydes mais ces derniers par contre possèdent une réactivité significativement plus élevée. Une réduction significative de la viscosité a été enregistrée en raison de la dégradation de la chaîne macromoléculaire qui produit la diminution du poids moléculaire et de l'extension de la conformation de la chaîne par ouverture de cycle.

L'oxydation partielle des alginates peut être avantageuse pour des applications biomédicales car ils se dégradent en milieu aqueux tandis que les alginates non modifiés ne sont pas dégradés [121].

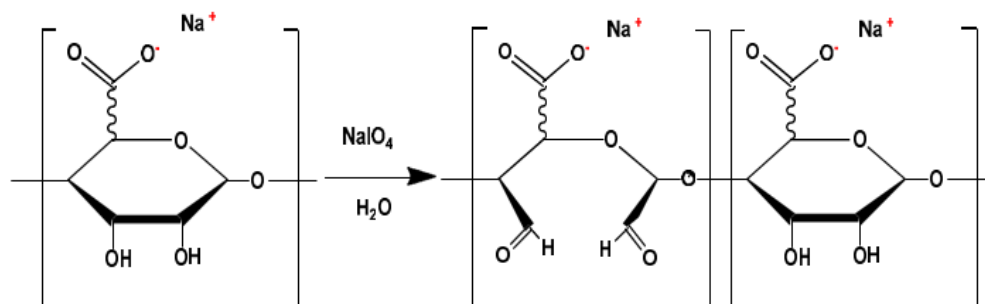


Figure I.13 : Oxydation de l'alginate de sodium par le NaIO_4 [122].

I.6.2.2. Oxydation par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Lewin et Ettinger (1969) [123] ont fait une étude approfondie de la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et la cellulose sous forme de fibres de coton purifié. L'oxydation par le peroxyde d'hydrogène a formé principalement des groupes cétoniques, principalement en C3. Au cours de l'oxydation, le degré de polymérisation a diminué également. Les cétones sont des carbonyles inactifs et autrement dit, ne provoquent pas une scission ; par conséquent, il n'y avait presque pas de jaunissement du coton lors de l'extraction alcaline ou à chaud. Zeronian et al., (1995) [124] ont suggéré que le radical perhydroxyl qui oxyde la cellulose dans une solution alcaline en C2 et C3 et que différentes réactions peuvent se produire, tout d'abord, en catalysant la production de radicaux libres, puis en diminuant le pH de la solution et provoquer l'hydrolyse acide (figure I.14) [124].

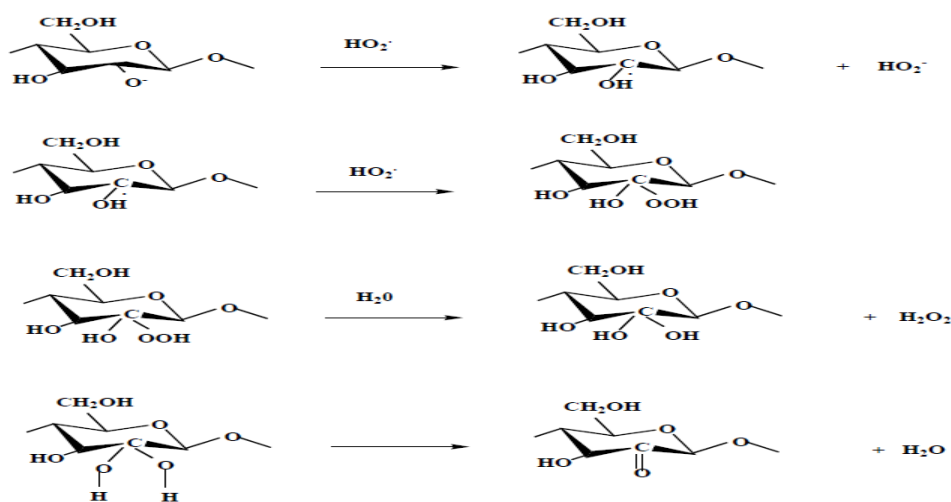


Figure I.14 : Oxydation de la cellulose par le peroxyde d'hydrogène [124].

I.6.2.3. Oxydation par le chlorite de sodium ($NaClO_2$)

La réaction d'oxydation du chitosane avec le chlorite de sodium en milieu homogène à un $pH=4,5$ implique une décomposition par oxydation simultanée des groupes alcools primaires CH_2OH , en carboxyles (figure I.16). En outre, l'oxydation hétérogène du chitosane par le chlorite de sodium à $pH=6,4$ conduit à la formation de liaisons covalentes de type amide entre l'atome d'azote du groupe amino et un atome de carbone du groupe carboxyle appartenant à de chaînes différentes. Selon les données potentiométriques de titrage, le nombre de groupes carboxyles dans le produit d'oxydation est environ 30% [125].

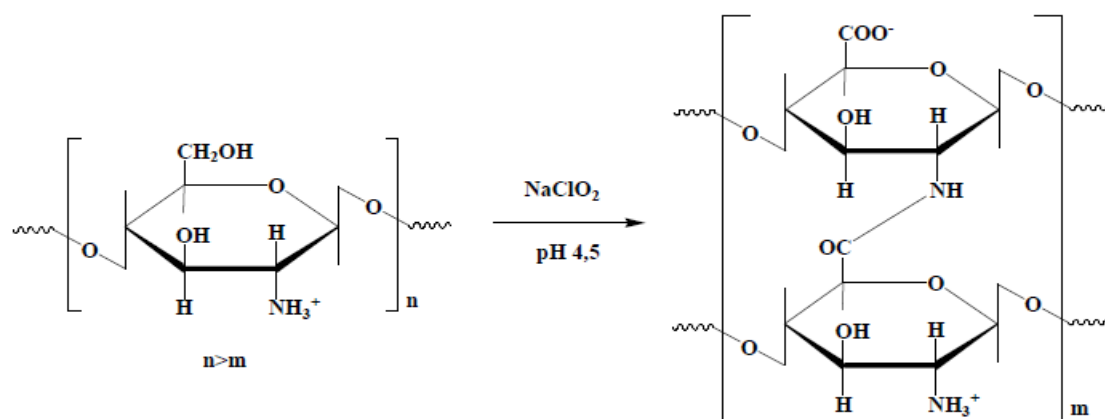


Figure I.15 : Oxydation du chitosane par NaClO_2 [125].

I.6.2.4. Oxydation par le permanganate de potassium (KMnO_4)

Lingbin et al. (2009) [126] ont démontré que l'alginate de sodium peut être partiellement oxydé avec le permanganate de potassium KMnO_4 en milieu acide. Ils ont trouvé que l'oxydation de l'alginate par le KMnO_4 conduit à un clivage des diols vicinaux en deux groupes aldéhydes (figure I.17). Le degré d'oxydation peut être contrôlé par le pH et la quantité de KMnO_4 . Ce type d'oxydation fournit une nouvelle méthode pour obtenir l'alginate partiellement oxydé et d'améliorer les propriétés de celui-ci pour des applications biomédicales. Après oxydation, le poids moléculaire de l'alginate se réduit et sa vitesse de dégradation est en fonction du degré d'oxydation. Ce dernier a été suivi par la diminution de la viscosité et la masse moléculaire.

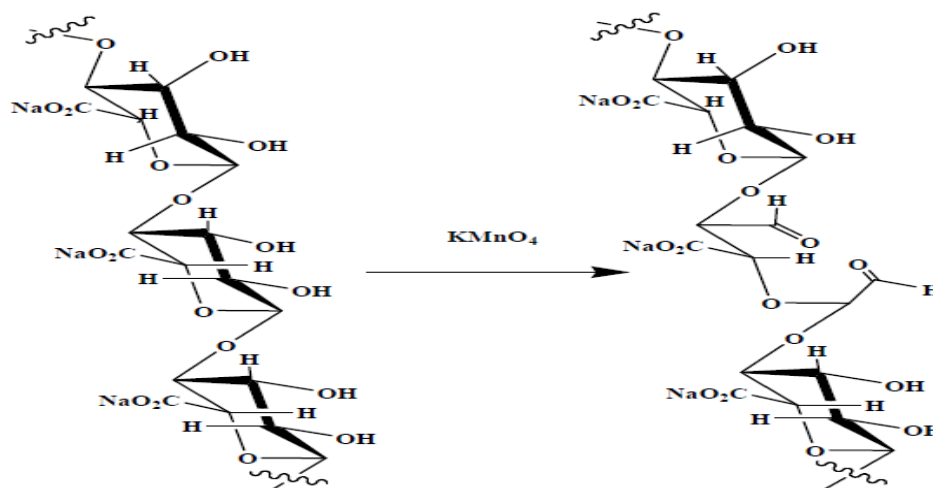


Figure I.17 : Oxydation de l'alginate de sodium par le permanganate de potassium [126].

I.7. Conclusion

Après étude bibliographique détaillée sur les polysaccharides, ainsi leurs modifications chimiques par les différents procédés qui ont été investigués par un grand nombre de chercheurs. Nous avons constaté qu'il y'a plusieurs paramètres mis en œuvre pour l'obtention de nouveaux matériaux.

Nous devons mentionner qu'en chimie organique les groupements issus des oxydations qui peuvent être conduits d'une manière sélective, contrôlée et permet l'obtention à de nouveaux polysaccharides oxydés dont leurs usages se diversifient et s'intensifient au cours de ces dernières années. Nous avons opté pour l'oxydation de la CMC par le periodate de sodium (NaIO_4), ce qui favorise clairement l'augmentation avec le temps des teneurs en aldéhydes. Le but principal de cette partie est de modifier les caractéristiques de la carboxyméthylcellulose entre autre les rendre oxydés, puis les rajouter aux chitosane pendant leurs synthèses afin d'assurer la réticulation covalente. Le chapitre suivant est consacré à l'obtention des hydrogels sous forme de films, à base de polysaccharides et de protéines.

Chapitre II

II.1. Introduction

Parmi les biomatériaux utilisés dans le domaine médical, les hydrogels à base de biopolymères, comme l'alginate, la CMC et le chitosane, sont particulièrement attractifs. En effet, ils présentent une structure proche de celle des macromolécules composant les tissus humains, une faible cytotoxicité, une bonne biocompatibilité et un coût relativement bas [127]. Dans ce chapitre, après avoir présenté les hydrogels et les méthodes de leurs obtentions ainsi que leurs différentes familles issu de polysaccharides et de protéines, nous donnerons un aperçu de leurs propriétés remarquables puis présenterons les applications de libération des molécules encapsulées dans ces systèmes. Ces hydrogels sont des réseaux à trois dimensions de polymères gonflés d'eau, qui peuvent être réticulés de manière chimique ou physique. Les caractéristiques notables et versatiles de ces gels en font des biomatériaux supports largement utilisés pour un grand nombre d'applications dans les secteurs des biotechnologies, biomédical (par exemple le traitement des affections de peaux), pharmaceutique, de la cosmétique ou encore de l'agroalimentaire.

Nous décrirons, au moyen de quelques exemples, la place de chitosane et de CMC dans le domaine biomédical. Nous avons choisi ces deux polymères car ils représentent les matériaux qui ont servi de base aux recherches exposées dans ce mémoire. Nous terminerons en présentant le contexte scientifique de notre étude qui concerne l'obtention des films hydrogels à base de polysaccharides et des protéines.

II.2. Considérations générales sur les hydrogels

Wichterle et al. ont élaboré pour la première fois des hydrogels en les utilisant comme lentilles de contact dans les années 1960 [128]. Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels de polymères hydrophiles ayant la capacité d'absorber de très grande quantité d'eau ou de fluide biologique, sans se dissoudre et sans perdre leur structure. Ce réseau est formé par la réticulation des chaînes de polymère, par des liens covalents (réticulation chimique) ou par des liens hydrogènes, ioniques ou hydrophobiques (réticulation physique) [129]. Pour le contrôle des propriétés physiques de ces hydrogels on a recours à la réticulation des polymères par des méthodes chimiques et/ou physiques [130]. Des critères classifient les hydrogels dans diverses catégories tels que la nature du réseau, la structure physique, la réticulation et le type d'interaction avec les tissus vivants.

La présence de groupes hydrophiles dans leur structure, tels que des groupements hydroxyles (-OH-), carboxyle (-COOH-), amide (-CONH- ou -CONH₂-), amine (-NH₂) ou

sulfonique (-SO₃H-) permet cette grande absorption d'eau qui les caractérise [131].

La proportion d'eau à l'intérieur de l'hydrogel est caractérisée par trois paramètres critiques, à savoir la fraction volumique de polymère à l'état gonflé, le poids moléculaire moyen entre deux réticulations ainsi que de la taille de maille du réseau. Malgré la modification substantielle du volume lors du gonflement, les hydrogels gardent l'intégrité, en outre ils sont biocompatibles et cytocompatibles [132].

La grande quantité d'eau absorbée leur confère des propriétés semblables à celles des tissus vivants, et les rend donc très intéressants pour des applications biomédicales. Elle détermine également leurs propriétés mécaniques, leur perméabilité, leurs propriétés de surface et leur biocompatibilité. La structure des hydrogels permet également à des molécules de différentes tailles de diffuser vers l'intérieur ou vers l'extérieur du réseau, ce qui les rend intéressants pour des applications de livraison de médicament [133]. La vitesse et les mécanismes de diffusion peuvent être contrôlés en modifiant des facteurs tels que la composition du polymère, la densité de réticulation, le contenu en eau et la cristallinité, ect [134,135]. En réponse aux sollicitations mécaniques, les hydrogels ont un comportement élastique prononcé et lors de la compression une contraction du volume et la croissance de la densité sont observées [136]. Les propriétés des hydrogels ont été utilisées pour l'élaboration de systèmes transdermiques par des plusieurs groupes de recherche [137,138].

Les hydrogels sont donc largement utilisés pour des applications biomédicales telles que la livraison de médicament, la formation de matrice pour la régénération et la réparation de tissus, les implants et les lentilles de contact souples [139]. L'un des avantages de l'utilisation des hydrogels comme matrices pour la libération contrôlée des médicaments est leur capacité à présenter une transition de phase d'ordre I sous l'influence des paramètres externes: pH, température, la force ionique, champ magnétique et champ électrique.

II.2.1. Définition des hydrogels

Les hydrogels peuvent être définis comme des matériaux polymères [140], ayant une forme propre et une structure de réseau tridimensionnel [135, 141] (figure II.1), sont des milieux transparents, gonflent dans un fluide hydrophile et ne présentant pas d'écoulement à l'état stable. Comme le terme « réseau » l'implique, la réticulation est nécessaire pour éviter la dissolution des chaînes de polymère hydrophile dans la phase aqueuse. Il s'agit d'un objet macroscopiquement solide qui présente à la fois les propriétés cohésives d'un solide et les propriétés de transport diffusif propres à un fluide. La phase solide peut être constituée de nanoparticules ou de films à base de macromolécules liées entre elles de façon physique ou

chimique. Le fluide peut être l'air (aérogel, xérogel), ou un liquide comme l'huile, l'alcool ou l'eau. Dans ce dernier cas, on parle alors d'hydrogel. Cependant, pour être qualifié d'hydrogels, ils doivent contenir au moins 20 %m d'eau, mais beaucoup sont plus fortement hydratés et présentent des taux allant de 60 à 99 %m. Au-delà de 95 %m, on parle de super absorbant [142].

Ces hydrogels incluent des homopolymères[135,143],copolymères [135,144] ou des réseaux de copolymères de molécules hydrophiles [145] absorbant une grande quantité d'eau [143,146], solvant organique, fluide biologique [147] ou fluide physiologique, sans se dissoudre [143]. Ceci est dû soit à la réticulation physique de type enchevêtrement, liaisons associatives telles que liaison hydrogène, liaisons de Van der Waals entre les chaînes ou cristallines [148] soit à des réticulations chimiques dues à la présence des liaisons chimiques covalentes ou ioniques [144]. Quand l'hydrogel est immergé dans un solvant compatible thermodynamiquement, le solvant diffus dans l'hydrogel, mène le réseau de polymère à un volume d'expansion considérable et le réarrangement macromoléculaire dépend de l'ampleur de l'agent réticulant. Ce taux de gonflement dépend de deux processus, du taux de relaxation relative aux chaînes de polymère et de la diffusion du solvant dans le réseau [143].

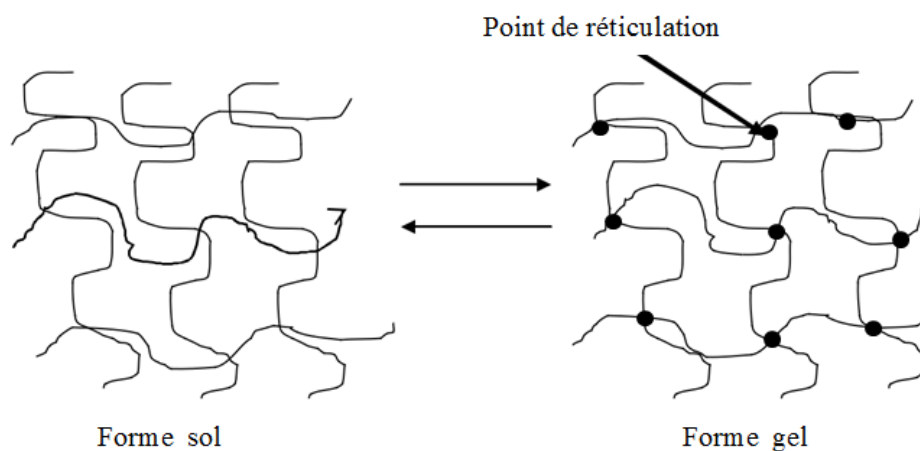


Figure II.1: Structure d'un réseau (transition sol – gel) [149].

Les gels peuvent être divisés en différents groupes suivant leur [142]:

- ❖ Origine (naturelle ou synthétique)
- ❖ Structure (amorphe, semi-cristalline, réseau de liaisons hydrogène, etc.)
- ❖ Charge électrique (ionique ou neutre)
- ❖ Réponse aux stimuli externes (sensible « hydrogels intelligents » ou insensible).

II.2.2. Classification des hydrogels

Leur structure est basée sur la méthode de préparation, donc ils peuvent être: des hydrogels homopolymères, des hydrogels copolymères, des hydrogels de polymères multiples, ou des réseaux interpénétrés. Les hydrogels homopolymères sont des réseaux réticulant d'un seul monomère hydrophile, tandis que les hydrogels copolymères sont synthétisés par réticulation de chaînes formées de deux unités de monomère, au moins un des monomères doit être plus hydrophile que l'autre pour rendre l'hydrogel plus absorbant.

Les hydrogels de polymères multiples sont des réseaux interpénétrés, quand les deux polymères forment des réseaux qui s'interpénètrent, soit des réseaux semi-interpénétrés quand un polymère linéaire interpénètre les réseaux et d'un autre polymère déjà réticulé.

Les hydrogels peuvent être: neutres (figure II.2.a) ou ioniques (cationique ou anionique) (figure II.2 b et c), selon la nature de base des groupements type de charges latérales et pendant (figure II.2 d) selon leur caractéristique mécanique et structurale.

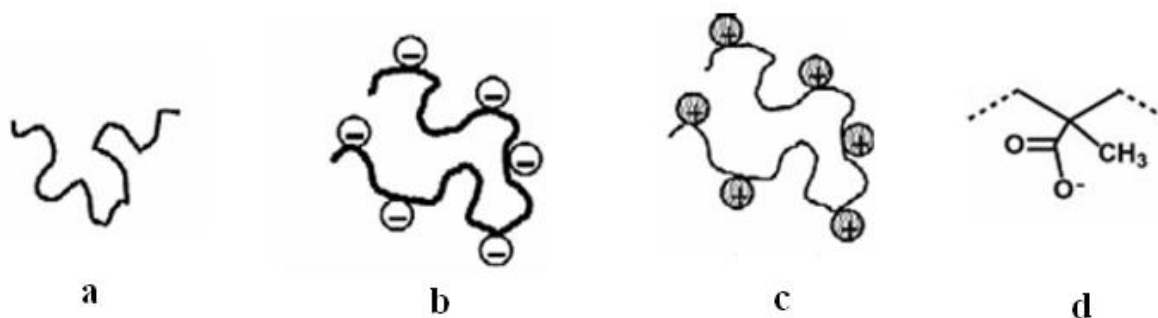


Figure II.2 : Différents types d'hydrogels : (a) neutre, (b) anionique, (c) cationique et (d) avec des groupements pendants ioniques [144].

Les hydrogels peuvent être classés selon une structure physique caractéristique tels que : les hydrogels amorphes, les hydrogels semi cristallins ou les hydrogels de complexe interpolymère (formation des liaisons hydrogènes) (figure II.3). Les hydrogels amorphes ont leur chaîne macromoléculaire arrangée aléatoirement. Les hydrogels semi cristallins caractérisés par des régions denses où les chaînes macromoléculaires sont bien ordonnées (cristallins). Les hydrogels de complexe interpolymère ou de liaisons hydrogène peuvent être responsables de la structure tridimensionnelle formée [150].

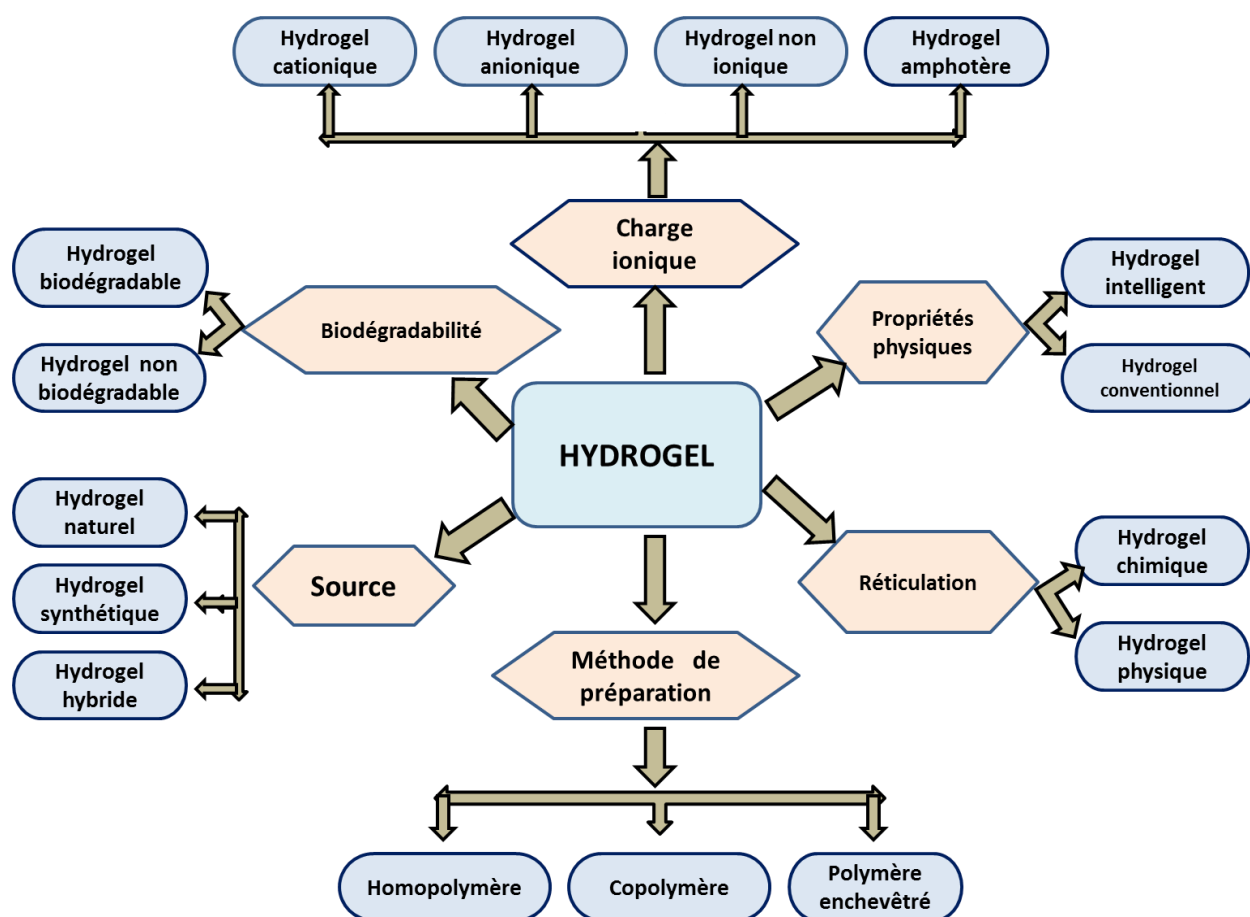


Figure II.3 : Classification des hydrogels [151].

II.3. Hydrogels de chitosane (référence)

Les aldéhydes, les composés époxy, les esters sont des agents de réticulation chimiques couramment utilisés pour préparer des hydrogels à base de chitosane, et le tripolyphosphate de sodium ou le sulfate de sodium ont été utilisés comme agents de réticulation ioniques. Les hydrogels de chitosane peuvent se former par liaisons permanentes ou non-permanentes. Les différentes réticulations possibles et les applications associées ont été résumées par Berger et al [152]. Le chlorure de tétrakis-hydroxyméthyl -phosphonium (THPC) est l'un des agents de réticulation qui réagit avec les groupes amines du CS pour former l'hydrogel correspondant. Le THPC change la couleur de l'hydrogel et le rend cassant et friable. Le chitosane peut être réticulé par exemple en augmentant la concentration du polymère. Il y a alors formation de liaisons hydrophobes dues aux groupements acétamides conduisant à la formation d'un gel réversible. En fait, le chitosane est le plus souvent réticulé par des liaisons covalentes en présence d'aldéhyde, tels que le formol (CH_2O), le glyoxal ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2$) et le glutaraldéhyde ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$) en milieu acide ou basique.

La réaction régissant la réticulation consiste à former une base de Schiff (imine) (figure II.4). En milieu acide, le mécanisme de la réaction est le suivant :

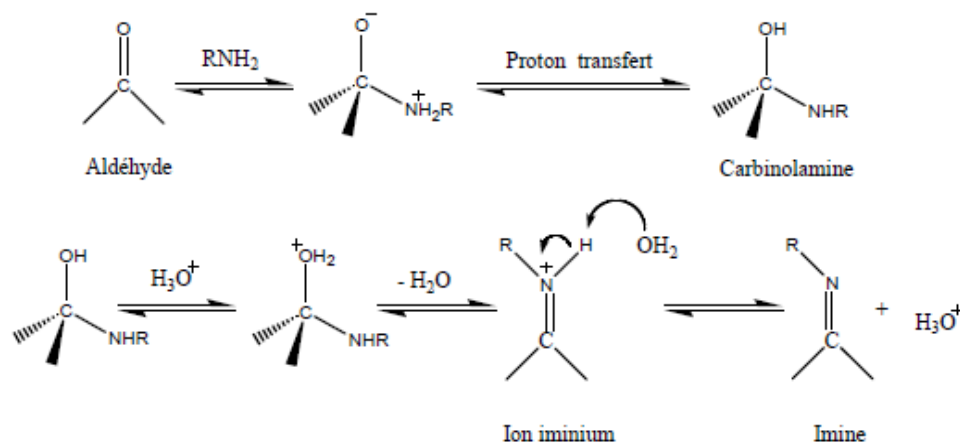


Figure II.4 : Mécanisme de réticulation du chitosane par formation de liaisons chimiques avec un aldéhyde [153].

C'est une réaction de condensation entre l'aldéhyde et une amine en présence d'hydrogène labile. Les gels de chitosane permettent l'encapsulation et le transport d'un grand nombre de molécules thérapeutiques des plus simples telles que la caféine aux plus complexes comme les protéines. Un paramètre important à considérer pour la formation de l'hydrogel est le pH pendant la réaction de réticulation. En effet, si le pH est trop élevé, les charges positives du chitosane sont neutralisées et le système précipite. Afin d'éviter la précipitation du chitosane, le pH de la solution ne doit pas être supérieur à 6 [154]. Ainsi, des recherches antérieures ont montré que l'hydrogel formé par l'agent de réticulation et le chitosane détermine une matrice avec une structure poreuse. Les pores ont une morphologie unique en fonction de l'agent de réticulation utilisé.

Les propriétés physiques et chimiques des gels de chitosane sont modulables. Elles peuvent être contrôlées en particulier par le degré de déacétylation [155], l'acide utilisé pour dissoudre le polymère ou par l'ajout de CMCOx (carboxyméthylcellulose oxydé) pour former des réseaux semi-interpénétrés de chitosane/CMCOx ; c'est cette méthode que nous utiliserons dans le cadre de cette thèse. Ces systèmes ont ainsi été développés pour produire des matrices à libération contrôlée de médicaments au niveau de la peau. La présence de CMC, dont le caractère hydrophile favorise la pénétration du solvant, dans un gel de chitosane entraîne une augmentation des propriétés de gonflement du gel. Ceci entraîne alors la libération de médicament contrôlée par le pH du milieu de relargage. Les propriétés des hydrogels et la libération du médicament à partir de ces systèmes d'administration dépendent du type d'agent de réticulation utilisé et de sa concentration.

II.4. Mécanismes de formation des hydrogels

Il existe un grand nombre de polysaccharides d'origine animale, végétale ou bactérienne capables de former des gels, soit de manière spontanée sous l'influence de paramètres extérieurs (pH, ions, température...). Les hydrogels sont préparés par transformation des chaînes linéaires d'une solution aqueuse de polymères hydrophiles en un réseau de macromolécules liées entre elles par des points ou jonctions de contact. La transition entre ces deux états est appelée gélification ou réticulation, et responsable de l'emprisonnement de l'eau à l'intérieur du gel [156]. On distingue deux types de gels selon la nature des liaisons entre les macromolécules constituant le réseau : les gels physiques et les gels chimiques [157].

II.4.1. Les gels physiques

Les gels physiques sont formés de polymères reliés entre eux par des interactions faibles et les nœuds de réticulation, ne sont pas permanentes. Ce caractère transitoire vient du fait que leur énergie est finie et du même ordre de grandeur que l'agitation thermique. Le nombre et la « force » des nœuds de réticulation dépendent donc directement des états thermodynamiques et mécaniques du gel. Les principales interactions faibles exploitées pour former des gels physiques qui sont maintenus par des liaisons de faible énergie tels que les liaisons hydrogène, les interactions ioniques, les forces de Van der Waals, les interactions hydrophobes et les interactions électrostatiques [158,159]. Il découle parfois de celles-ci d'autres interactions physico-chimiques plus complexes telles que la stéréocomplexation ou la formation d'édifices supramoléculaires (complexe d'inclusion) qui peuvent également être responsables de la formation d'un gel [157]. Des représentations simples du mécanisme de chacune de ces interactions sont décrites ci-dessous (figure II.5).

Les gels physiques sont généralement moins homogènes que les gels chimiques, sont donc dits « réversibles », car il est possible de franchir la barrière de transition (sol/gel), à l'infini, par de simples changements des conditions du milieu, tels que la force ionique, le pH, ou la température. Quand un polyelectrolyte est combiné avec un ion multivalent de charge opposée, il peut former un hydrogel physique connu sous le nom d'hydrogel « ionotropique » c'est le cas de l'hydrogel d'alginate de calcium [160].

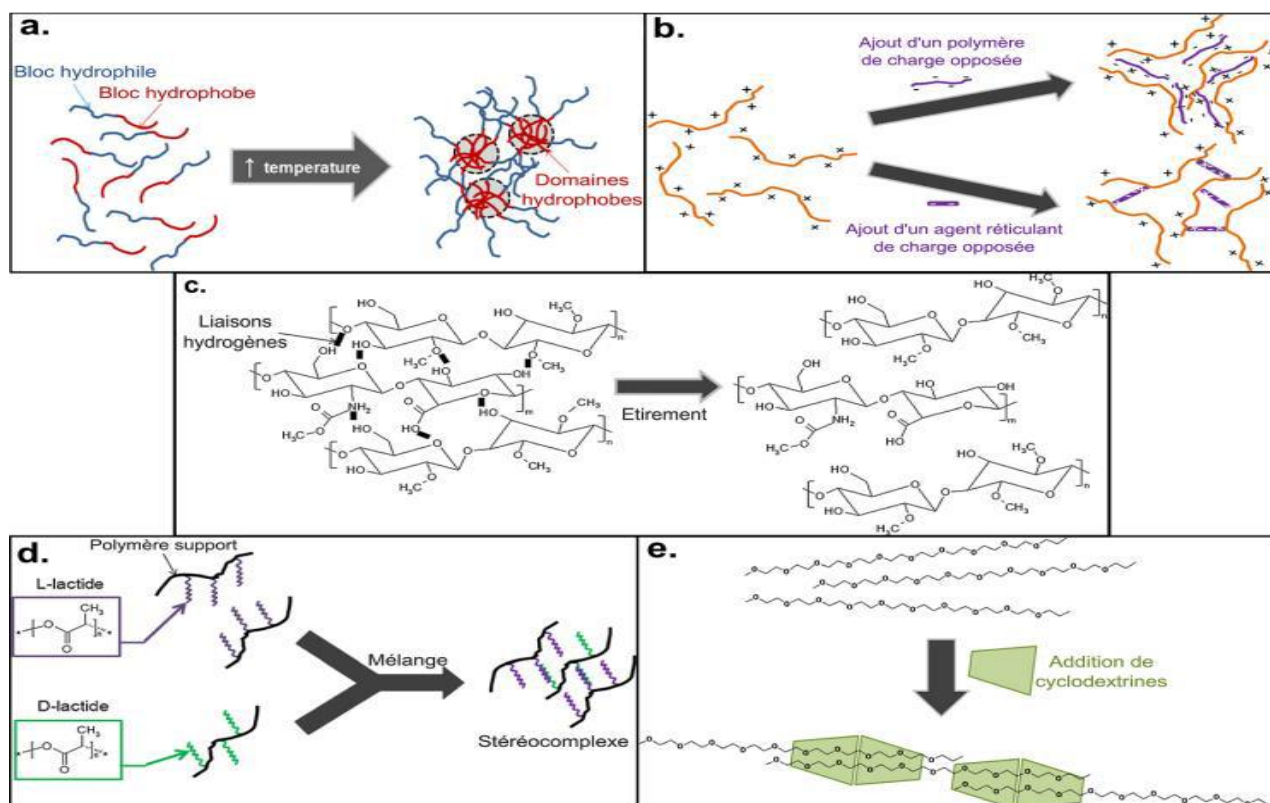


Figure II.5 : Mécanismes de gélification physique in situ par (a.) interactions hydrophobes, (b.) interactions de charges, (c.) liaisons hydrogène, (d.) stéréocomplexation et (e.) assemblage supramoléculaire [135].

II.4.2. Les gels chimiques

Les hydrogels chimiques (ou permanents) à base de polysaccharides sont généralement obtenus par polymérisation de macromonomères, préparés par greffage chimique d'un monomère sur le squelette polysaccharidique, ou après réticulation à l'aide de réactifs dysfonctionnels. Ces gels chimiques sont stabilisés par des liaisons covalentes entre les macromolécules. Ces liaisons étant stables et leur nombre ne variant pas en fonction des contraintes mécaniques ou de la température, les gels chimiques sont dits « irréversibles ». Dans la réticulation chimique, un agent de réticulation bi-fonctionnel est ajouté à une solution d'un polymère hydrophile. Cependant, le polymère doit avoir un groupement fonctionnel adapté pour réagir avec l'agent de réticulation [161]. Cette technique permet en augmentant la stabilité et en prévenant la dissolution des hydrogels de chitosane. Comme tous les autres polysaccharides, le chitosane peut être réticulé de manière covalente avec le glutaraldéhyde [162]. Lu et Coll, ont utilisé poly (alcool vinylique) avec poly (acide acrylique) par variation de pH, il se forme un réseau tridimensionnel de chaînes réticulées chimiquement entre elles [163].

Une particularité des gels chimiques est le « temps de gel », aussi appelé « point de gel », qui désigne le temps nécessaire pour associer un changement brusque des propriétés viscoélastiques qui correspond à la formation du réseau macromoléculaire au sein du gel et il peut être déterminé par des mesures rhéologiques. La gélification totale (réticulation complète) n'est généralement atteinte que longtemps après ce temps de gel. Les nœuds de réticulation du réseau ont ainsi un caractère permanent et ne dépendent pas de facteurs extérieurs (température, pH, concentration, déformation mécanique).

Les principales méthodes de préparation des gels chimiques incluent l'utilisation d'agent de réticulation, la polymérisation radicalaire, la réaction entre fonctions chimiques complémentaires (réactions d'addition, de condensation, etc.), l'irradiation de haute énergie (rayons gamma, lumière) et parfois l'utilisation d'enzymes [157,164], (Figure II.6).

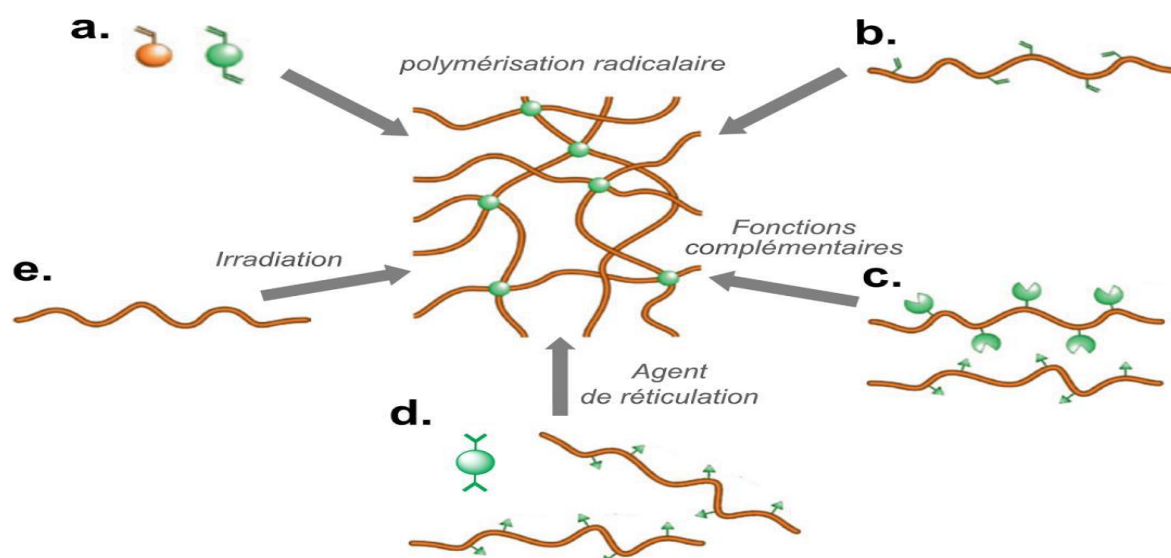


Figure II.6 : Représentation des principales méthodes de synthèse des hydrogels chimiques : (a) polymérisation radicalaire de monomères (ici monomères vinyliques), (b) polymérisation radicalaire de polymères fonctionnalisés, (c) réactions chimiques entre fonctions complémentaires, (d) ajout d'un agent de réticulation (en vert) et (e) irradiation [157].

Un exemple d'hydrogel est celui formé par l'intermédiaire d'un lien imine par réaction de Schiff entre une amine et un carbonyle [157,164]. Certaines de ces réactions peuvent être déclenchées de façon contrôlée par des changements de conditions telles que la température ou le pH [165].

II.5. Caractérisation des gels chimiques

La grande difficulté de caractériser un réseau polymère réside dans son hétérogénéité. En effet, les réseaux idéaux sont très rares, même si de nombreuses synthèses basées sur des réticulations spécifiques ont été explorées. Un réseau macromoléculaire peut être défini par différents paramètres : sa transition sol-gel, la fraction sol, la densité de réticulation, la longueur moyenne entre nœuds et sa capacité de gonflement. Autre difficulté, le contrôle du taux de réticulation de manière directe. En effet, les nœuds de réticulation, souvent hydrocarbonés, en faible quantité sont difficilement quantifiables.

D'une manière indirecte, le taux de réticulation d'un hydrogel peut être évalué par le taux de gonflement dans des milieux aqueux. Evidemment, un taux de gonflement plus faible signifie un taux plus élevé de réticulation.

II.6. Méthodes pour l'obtention des hydrogels

Les hydrogels basés sur les polymères naturels ou/et synthétiques ont prouvé leur intérêt dans la libération prolongée et soutenue de médicament au niveau local ou systémique. L'état d'hydrogel est un état dans lequel une grande quantité de solvant est placée entre les chaînes de polymère, et les réseaux de polymères sont formés par réticulation. La structure réticulée peut être formée soit par des liaisons covalentes irréversibles ou par des liaisons physiques intermoléculaires. Le processus de réticulation représente un outil par lequel les hydrogels peuvent s'adapter aux exigences de chaque application (le taux de biodégradabilité, la biocompatibilité, les propriétés mécaniques, le degré de gonflement, la capacité d'inclusion/libération des principes actifs, la porosité, etc). Les réseaux polymères réticulés covalents ou physiquement ne se dissolvent pas dans des solutions aqueuses. En effet, les hydrogels sous forme de films possèdent des propriétés de gonflement qui leur permettent ainsi d'absorber de grandes quantités d'eau ou fluide biologique.

II.6.1. Obtention des hydrogels par réticulation ionique

Les hydrogels physiques peuvent se former par interaction ionique avec une durée de vie plus courte dans le milieu biologique entre un polysaccharide chargé et des ions le plus souvent divalents de charge opposée avec des propriétés de biocompatibilité supérieures on a fait appel à l'utilisation d'agents de réticulation ionique comme les sulfates, les citrates et les phosphates ou les anions métalliques [166,167]. Les hydrogels ioniques sont des hydrogels polyelectrolytes formés par des monomères chargés positivement ou négativement, pouvant donc être cationiques, anioniques ou ampholytiques. Ce type de réticulation peut se réaliser

soit par l'immersion dans une solution contenant le réticulant ionique soit par un mélange de la solution polymère avec la solution de réticulant. Ces méthodes de préparation d'hydrogels physiques sont extrêmement douces et simples. La formation de ces hydrogels, très souvent biocompatibles, représente une alternative à la formation d'hydrogels chimiques nécessitant l'utilisation d'agents de réticulation souvent toxiques ou de longues étapes de purification.

Le chitosane, par exemple est un polysaccharide chargé positivement qui forme des gels physiques par interactions ioniques avec des polyanions chargés négativement (par exemple l'anion sulfate SO_4^{2-}) de petite ou grande masse molaire [152, 168].

L'ionisation des groupes fonctionnels du polymère et de l'agent de réticulation, outre le caractère hydrophile des matériaux, le degré de réticulation ou le pH déterminent la capacité de gonflement de ces hydrogels.

Le tripolyphosphate de sodium (TPP) est le polyanion le plus couramment utilisé pour la réticulation ionique du chitosane sous forme de microparticules pour inclure le 5-fluorouracile [169], des protéines ou des plasmides [170], la ciprofloxacine [171] ect...

De même, le chlorure de calcium [172], le sulfate de sodium [173] ou d'autres molécules comme les aminoacides ont été utilisés en qualité d'agent de réticulation ionique.

II.6.2. Obtention des hydrogels par interactions hydrogène

Les chaînes polymères peuvent également participer à la formation d'un hydrogel [174] par des interactions faibles telles que les interactions hydrogène entre un atome d'hydrogène et des atomes d'azote, oxygène et fluor par exemple [175]. Une liaison hydrogène est formée par l'association d'un électron déficient d'un atome d'hydrogène et un groupe fonctionnel de forte électronégativité.

Des exemples des protéines et des polymères réticulés par des interactions hydrogène sont le collagène et la gélatine, le poly (alcool vinylique), des mélanges poly (alcool vinylique)/POE (poly (oxyde d'éthylène)), et d'autres. À l'aide de la technique congélation/décongélation on peut obtenir des hydrogels à base de poly(alcool vinylique) par interactions hydrogène [176]. C'est parce que les groupements hydroxyles des polysaccharides forment des liaisons hydrogène puis une double hélice, ce qui est considéré comme former une réticulation par formation de complexe [177]. Plusieurs formulations injectables ont à la base des hydrogels formés par des interactions hydrogène avec des propriétés viscoélastiques supérieures aux polymères les constituants, propriétés attribuées à ces interactions labiles [135]. Les hydrogels développés par cette technique sont affectés par

de nombreux facteurs, tels que la concentration en polymère, le rapport molaire de chaque polymère, le type de solvant, la température de la solution, et le degré d'association entre les fonctionnalités de polymère [161].

Phadke et al. ont démontré le rôle des interactions hydrogène dans l'élaboration des hydrogels intelligents, hydrogels covalents capables d'autocicatriser après la rupture préalable [178].

Les réseaux polymères qui possèdent des interactions hydrogène peuvent se dissoudre et se disperser dans le milieu aqueux dans un temps très court [135].

II.6.3. Obtention des hydrogels par interactions hydrophobes

Une autre méthode pour obtenir des hydrogels passe par des interactions hydrophobes entre les polymères et les copolymères. Des domaines hydrophobes agissent en tant que points de réticulation sont associés à l'ensemble de la structure polymère, et sont entourés par des domaines hydrophiles absorbant l'eau [161] et peuvent réticuler en milieu aqueux par thermogélification réversible. Cette approche a été utilisée pour développer un hydrogel à base d'un copolymère du type greffé hydrophile ou par la synthèse directe d'un copolymère à blocs pour obtenir un polymère amphiphile hydrosoluble à basse température. Lorsque la température augmente, les domaines hydrophobes s'associent pour minimiser le contact avec l'eau. Cette température dépend de la concentration du polymère, de la longueur de la chaîne hydrophobe et de la structure chimique du polymère [175]. Ces matrices peuvent être utilisées dans l'ingénierie tissulaire du cartilage ou dans la libération contrôlée de médicament [179]. Parmi les structures chimiques des blocs hydrophobes susceptibles de gélifier aux températures proches des conditions physiologiques, on remarque: le poly(oxyde de propylène), le copolymère de l'acide lactique avec l'acide glycolique, le poly(fumarate de propylène), le polycaprolactone, le polyuréthane et d'autres [175]. Les caractéristiques mécaniques de ces polymères hydrophobes combinés sont pauvres en raison de la mauvaise adhérence inter faciale. En utilisant les interactions hydrophobes apparues entre les chaînes polymères comme une méthode complémentaire aux interactions hydrogène, des matrices ont été réalisées dont la stabilité à la rupture a été améliorée. Cependant, cette approche pour la préparation d'hydrogel présente certains avantages tels que le faible coût du système [161].

II.6.4. Obtention des hydrogels par réticulation covalente

Par opposition aux gels précédents, les gels chimiques sont constitués de chaînes polymères liés entre elles par des liaisons covalentes. Du fait de l'existence de ces liaisons covalentes entre chaînes, les matériaux formés sont insolubles quel que soit le solvant, mais,

selon leur compatibilité avec ce solvant, ils peuvent l'absorber en plus ou moins grande quantité [180] et leur taux d'hydratation ou de gonflement dépendra fortement de la densité de leur réticulation [181]. On obtient des réseaux interpénétrés par l'introduction dans le système d'un polymère différent qui peut participer soit séparément à une réaction de réticulation en formant ainsi des réseaux « full-IPN » (Interpenetrated networks) soit rester dispersé dans le gel formé du premier polymère réticulé en formant des réseaux semi-interpénétré.

La réticulation covalente des chaînes polymères peut se réaliser soit sur le même polymère (la réticulation ayant lieu sur des unités structurales qui appartiennent à la même chaîne macromoléculaire ou sur des chaînes différentes) ou sur un mélange de polymères (chaque polymère contribuant à la réaction avec une unité fonctionnelle). Les hydrogels covalents peuvent être obtenus avec l'utilisation de petites molécules de réticulant, par polymérisation secondaire ou par irradiation. Cette méthode de réticulation se fait par réaction chimique entre un agent réticulant, notamment le glutaraldéhyde [182,183] ou l'épichlorhydrine [184], et deux fonctions amines nucléophiles. Bien que l'aldéhyde glutarique soit utilisé dans de nombreux travaux de recherche comme agent de réticulation des polysaccharides et des protéines, d'autres études devraient être menées sur son métabolisme et son excrétion dans le corps humain, et il a été montré que la morphologie de l'hydrogel obtenu est poreuse et que les pores sont uniformément répartis dans le réseau polymère formé. Le problème dans l'utilisation de ces réticulants covalents est connu pour être cytotoxiques [185] qui peuvent constituer un obstacle à des applications médicales. Pour cela, dans le cadre de cette recherche, on a utilisé un dérivé de CMC respectivement la CMC oxydée, un agent réticulant naturel, capable à réagir avec le chitosane qui formé de réseaux à caractère hydrogels sous forme de films. C'est pourquoi les hydrogels sont soumis à des purifications rigoureuses afin d'améliorer la compatibilité avec l'organisme qui complique et augmente le prix de production d'un biomatériau.

Pour la réticulation chimique du chitosane des molécules bifonctionnelles ou macromolécules diverses contenant des aldéhydes comme le formaldéhyde, le glyoxal, le glutaraldéhyde (GA), la génipine, les diacrylates ont été utilisées. Ces hydrogels présentent des propriétés mécaniques supérieures aux hydrogels physiques [179].

II.7. Utilisation des hydrogels pour de bioapplications

Les hydrogels sont des réseaux qui peuvent absorber de l'eau ou des solutions aqueuses. De tels types de gels, appelés gels polyélectrolytiques, peuvent absorber plusieurs centaines de fois leur propre poids en solvant [154]. C'est pour cela que ces gels sont utilisés

dans des domaines variés tels que l'industrie pharmaceutique et alimentaire, le cosmétique et le domaine médical.

Dans ce projet, des hydrogels à base de chitosane et de carboxyméthylcellulose ont été développés ; ces deux polymères sont en effet biocompatibles, ils ne se dégradent pas avec le temps et ils présentent une méthode de réticulation qui est rapide et compatible avec le milieu biologique. Ils vont donc être présentés en détail dans cette thèse.

II.7.1. Hydrogels à base de polymères biocompatibles et biodégradables pour applications biomédicales

Les hydrogels sont très utilisés en biomédecine, ce qui a favorisé le développement de procédures de synthèse et d'assemblage bien contrôlées, à partir de polymères [186,187], de copolymères [188,189], ou encore de polymères fonctionnalisés [190,191]. La pertinence des hydrogels comme matériaux biomédicaux et leur performance dans une application donnée dépendent en grande partie de leur structure. Il existe une très vaste gamme de polymères utilisables pour la formation d'hydrogels pour les biomatériaux, à condition qu'ils soient biocompatibles. Le choix du polymère se fait surtout en fonction des besoins (délivrance ou encapsulation), du coût, de la disponibilité et de la reproductibilité du polymère.

Dans ce contexte, les hydrogels à base de polysaccharides (polymères naturels) sont préférables, en termes de biocompatibilité ; par rapport aux hydrogels à base de polymères synthétiques, ils présentent une meilleure biodégradabilité puisque l'organisme possède déjà les outils enzymatiques pour dégrader différents polysaccharides et protéines de l'organisme. De plus, les polymères naturels provoquent peu de réactions inflammatoires ou de toxicité, contrairement aux polymères synthétiques qui sont souvent issus de synthèses « dures », potentiellement sources de résidus toxiques [192]. La principale faiblesse des hydrogels à base de polysaccharides ou protéines est leur plus faible résistance mécanique par rapport aux hydrogels synthétiques [193,194].

II.7.2. Critères et principales propriétés pour la conception d'hydrogels injectables

Les caractéristiques des hydrogels en font des matériaux très recherchés pour un grand nombre d'applications dans les secteurs des biotechnologies, du biomédical, de la pharmaceutique ou encore de l'agroalimentaire suite à leurs propriétés notables et versatiles. De plus, la nature chimique et le mécanisme de formation du gel influencent fortement la compatibilité du biomatériau à contenir des cellules viables [195]. Les hydrogels utilisés comme biomatériaux dans les biotechnologies nécessitent certaines propriétés physico-

chimiques que l'on doit pouvoir caractériser et contrôler. Les hydrogels biodégradables doivent présenter une série de propriétés biologiques et mécaniques, telles que:

II.7.2.1. Cinétique de gélification

Un temps de gélification relativement court permet d'éviter la fuite de l'hydrogel hors du site dans lequel il est injecté, mais il doit cependant être suffisamment long pour permettre la migration du liquide jusqu'au site d'intérêt. En effet, la composition du gel change au cours du temps et de la réaction de réticulation. La rhéologie permet d'évaluer le module de conservation G' et le module de perte G'' en fonction du temps. G' représente la composante élastique en cisaillement et la portion réversible de la déformation, alors que G'' représente la composante visqueuse de la solution en cisaillement et la portion irréversible de la déformation suite à une sollicitation. Lorsque $G' < G''$, le matériau possède des propriétés attribuables aux liquides et lorsque le processus de gélification commence, G' va dépasser G'' , le matériau possédant alors des propriétés qui se rapprochent des solides [196].

II.7.2.2. Propriétés de gonflement dans des milieux aqueux

Le taux de gonflement à l'équilibre d'un hydrogel évalue sa capacité à absorber l'eau, et influence notamment ses propriétés mécaniques ; en général, ils peuvent gonfler dans les milieux aqueux de 10-98% par rapport à leur poids, en fonction du type de polymère, sa concentration, la densité de réticulation et les facteurs environnementaux tels que la température, le pH et la force ionique ou encore la lumière [157,197]. En effet, les chaînes polymériques interagissent avec les molécules d'eau et tendent à s'éloigner. Au contraire, le réseau polymérique, réticulé physiquement ou chimiquement, applique des forces attractives qui retiennent les chaînes. L'équilibre est atteint lorsque les forces de répulsion et d'attraction se compensent [157]. La capacité de rétention de l'eau des hydrogels apparaît en principe grâce à la présence de groupements hydrophiles, tels que les groupements amines, hydroxyles, carboxyles et sulfonâtes des chaînes macromoléculaires [198].

II.7.2.3. Propriétés mécaniques

Dans la formation de l'hydrogel, la phase liquide peut se déplacer au sein du réseau polymérique et les propriétés mécaniques du gel dépendent alors notamment de la vitesse de déformation, du temps de réaction, de la température et de la quantité et le type de solvant. La rigidité des hydrogels est communément évaluée à titre comparatif grâce à leur module élastique (module d'Young) par des essais en cisaillement et/ou en compression, et plus rarement en tension [199]. La rigidité des gels peut être influencée par de nombreux

paramètres tels que la concentration en polymère, la méthode de préparation, le taux de gonflement, le mode et degré de réticulation [157]. Les gels plus rigides sont moins déformables et peuvent casser lorsque la contrainte dépasse une contrainte seuil de rupture.

II.7.2.4. Porosité

La porosité est un des paramètres les plus importants pour assurer la migration, l'attachement et la prolifération des cellules ainsi que pour le transport des nutriments et l'incorporation de médicaments. La taille de pores idéale est cependant encore débattue et dépend du type cellulaire (de quelques micromètres à quelques centaines de micromètres) [200]. La structure du réseau (taille des pores), la composition du polymère, la nature et la taille des solutés sont autant de paramètres à prendre en compte dans le phénomène de diffusion. Différentes techniques existent pour créer de la porosité (réticulation, lyophilisation, gaz CO₂) et l'analyse de la morphologie des gels même à l'état gonflé peut être évaluée par microscopie électronique à balayage [199]. Cependant, cette technique présente des limites car elle analyse un hydrogel sec dont la structure et la porosité peuvent avoir été modifiés par le procédé de séchage (lyophilisation).

II.7.2.5. Biocompatibilité

La biocompatibilité se définit comme la capacité d'un biomatériau à remplir sa fonction sans engendrer d'effet indésirable chez son hôte. Cette propriété est essentielle pour éviter le phénomène de rejet du matériau ou des problèmes de toxicité. Durant des décades l'utilisation de biomatériaux polymériques était empirique, par la suite les chercheurs ont commencé à s'interroger sur les conséquences d'introduire un matériel étranger dans l'organisme à des buts thérapeutiques. Il est devenu évident que les caractéristiques structurales de l'implant, c'est-à-dire composition chimique, charge de surface, porosité, taille et forme, sont les facteurs importants déterminant la biocompatibilité.

En termes pratiques, la biocompatibilité d'un matériau polymérique (implants, microparticules) s'évalue *in vivo* et elle se caractérise par la réponse de l'hôte qui peut se manifester de plusieurs manières [201].

II.7.2.6. Biodégradabilité

La dégradation du gel peut être contrôlée par des méthodes physiques et/ou chimiques: il est possible de jouer sur la masse molaire des polymères ou leur composition pour contrôler la cinétique de dégradation *in vivo*. La vitesse de dégradation doit être comparable à la vitesse de régénération du tissu natif. La capacité des hydrogels à se résorber peut être provoquée par

voies enzymatique, hydrolytique ou environnementale (pH, température, etc...). L'utilisation d'enzymes est un exemple de méthode biologique permettant la dégradation des hydrogels [201].

Par la suite, nous détaillerons plus particulièrement les caractéristiques des hydrogels biocompatibles et leurs potentiels pour ces applications biomédicales.

II.7.3. Caractéristiques des hydrogels biocompatibles

En revanche, plusieurs caractéristiques rendent les hydrogels biocompatibles quand ils sont introduits dans le corps :

- Les hydrogels gonflent dans l'eau et entraînent un relâchement du réseau polymère permettant ainsi la libération du principe actif par diffusion.
- La nature hydrophile des chaînes polymériques favorise les propriétés hydrodynamiques des cellules à l'interface de l'hôte et prévient ainsi l'adsorption protéique et l'adhésion cellulaire de surface.
- Les hydrogels, après gonflement, acquièrent une certaine élasticité et subissent des pressions des tissus avoisinants sans être déformés tout en remplissant leur rôle. Cette élasticité baisse le risque d'altérer les tissus avoisinants par compression, irritation et friction [202].

II.8. Applications biomédicales des hydrogels

L'objectif de cette partie n'est pas de détailler de manière exhaustive toutes les applications des hydrogels, mais plutôt de donner un aperçu des principales utilisations possibles de ces matériaux en lien avec leurs caractéristiques physico-chimiques, illustrées par quelques exemples dans les domaines du biomédical et de la cosmétique [203].

Grâce à leur capacité de retenir une quantité significative d'eau [204], les hydrogels ressemblent assez bien aux tissus naturels vivants, ce qui les rend utiles comme systèmes de délivrance pour la libération contrôlée de médicaments et de gènes [205, 206], les lentilles de contact [207], l'ingénierie tissulaire [208], les biocapteurs [209], les matériaux dentaires, implants, systèmes injectables de polymères, matériaux hybrides (encapsulation des cellules vivantes) [210] et l'imagerie médicale.

II.8.1. Applications ophtalmologiques: lentilles de contact, implants oculaires, substituts du corps vitré.

II.8.2. Systèmes à libération contrôlée de médicaments ou substances bioactives

Une des applications importantes des hydrogels est leur utilisation en pharmaceutique pour la libération contrôlée de molécules bioactives. Un système de libération doit pouvoir contrôler le relargage du soluté en fonction du temps. Parmi les biomatériaux disponibles, les hydrogels possèdent un ensemble de caractéristiques qui les rend très adaptés à cette application car la diffusion des molécules actives peut être contrôlée.

Le choix du matériau et du réseau de l'hydrogel va gouverner la libération du médicament hors de la matrice. Les principaux critères à prendre en compte dans la fabrication de l'hydrogel avant son utilisation sont listés dans le tableau II.1.

Tableau II.1 : Critères de fabrication pour des hydrogels utilisés en relargage contrôlé. Adapté de [211].

Critères	Variables
Propriétés de transport	Taille et masse molaire de la molécule
Diffusion de la molécule	Masse molaire du polymère de l'hydrogel
	Densité de réticulation
	Interaction polymère-molécule
	Vitesse/Taux de dégradation de l'hydrogel
Propriétés physiques	Concentration en polymère/réticulant/initiateur
Conditions de gélification	Température, pH, force ionique
Propriétés de structure	Masse molaire du polymère
Biodégradabilité	Résistance mécanique
Réactivité aux stimuli	Concentration de groupes sensibles aux stimuli
Propriétés biologiques	Cytotoxicité de l'hydrogel
Biocompatibilité	Biodégradabilité

Dans la plupart des applications médicales, les hydrogels biodégradables sont favorisés puisqu'ils se dégradent assez rapidement dans des conditions relativement douces, et évitent ainsi une intervention chirurgicale supplémentaire de retrait d'un implant d'hydrogel non dégradé. La prédiction du temps de dégradation des hydrogels est cruciale pour garantir le succès du relargage du médicament et maximiser les effets thérapeutiques [211]. Les systèmes de distribution contrôlée de médicaments à base d'hydrogels peuvent être utilisés pour une application orale, oculaire, sous-cutanée ou épidermique. L'administration de médicaments par voie orale est la méthode la plus utilisée.

II.8.3. Pansements pour les plaies: les pansements stériles, bandage.

II.8.4. Applications des hydrogels dans l'industrie alimentaire: membranes, différentes formes d'adjuvants.

II.8.5. Applications des hydrogels en agriculture: bio-fertilisants.

II.8.6. Applications des hydrogels en cosmétiques: Les hydrogels sont également très utilisés dans le secteur de la cosmétique. Les principes actifs sont piégés dans le réseau, lorsque la formulation cosmétique est appliquée sur la peau dont le pH est autour de 6, le gonflement des microparticules d'hydrogel libère les actifs qui s'absorbent dans la peau [212].

II.9. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons examiné les différentes méthodes pour l'obtention des hydrogels de polysaccharides, en nous attardant sur la préparation des hydrogels et leurs utilisations dans le domaine biomédical et nous nous sommes limités aux polysaccharides les plus courants. Au cours de ces dernières années, de nombreuses recherches ont été réalisées dans le domaine médical, qui soulignent l'intérêt que peuvent avoir les hydrogels de chitosane pour des applications dans ce domaine.

Chapitre III

III. 3. Définition, structure : Aspect, utilité de la curcumine

La curcumine ou le diféruoylméthane est le pigment principal présent dans le curcuma, une poudre, est un polyphénol présent dans les rhizomes de *Curcuma longa* (famille des Zingiberaceae) (figure III.2). Elle est utilisée depuis des siècles dans la médecine indienne et chinoise pour le traitement des pathologies inflammatoires. C'est une molécule lipophile, comprenant deux groupements phénoliques, qui possède une large gamme d'activités biologiques comprenant une activité anti-inflammatoire, antioxydante, anti-cancéreuse, anti-microbienne, antispasmodique, anticoagulante, hépato-protective, hypocholestérolémiante et cicatrisante [214,215].

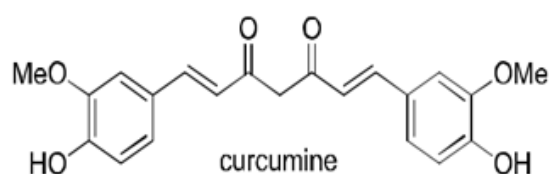


Figure III.2: Structure de la curcumine.

Le nom chimique de la curcumine est le 1,7-bis (4-hydroxy-3-méthoxy phényl)-1,6-heptadiène-3,5-dione ou diféruoylméthane ; c'est une molécule symétrique qui contient deux fonctions cétoniques séparées par un méthylène (-CH₂), et deux noyaux aromatiques dans les deux extrémités. Chacun des deux noyaux porte deux groupements : hydroxyle et méthoxy en position para et méta respectivement.

De par sa couleur jaune orangée, la curcumine a été traditionnellement utilisée comme colorant dans les matières grasses, dans les produits de la pêche préparés, dans les aliments en tant que colorant naturel E 100 ainsi que divers produits agroalimentaires, ...etc [216].

III .4. Les principaux composés du curcuma

Le curcuma contient énormément de micronutriments, mais son ingrédient actif reste les curcuminoïdes, pigments polyphénoliques, dont le principe actif majoritaire est la curcumine. Il contient aussi la déméthoxycurcumine, la dihydrocurcumine et la bisdéméthoxycurcumine. Le curcuma est également une bonne source de fibres alimentaires, de manganèse, de fer, de vitamine B6 et de la vitamine C. Il renferme également de l'huile essentielle, des quinoides, des stéroïdes dont le cholestérol et le campestérol, des phénylpropanoïdes, des monoterpènes, des benzénoïdes, des carbohydrates et des alcaloïdes.

C'est une poudre cristalline, jaunâtre et inodore, très peu soluble dans l'eau, l'éther de pétrole et le benzène. Soluble dans l'alcool éthylique, l'acide acétique glacial et le propylène

glycol, et très soluble dans l'acétone et l'éther éthylique. En plus, la curcumine est considérée comme un composé chimique non-nutritif et non toxique pour les mammifères même en doses élevées [217].

Cependant, sa nature lipophile conduit à une faible biodisponibilité une fois ingérée [218,219]. De plus, la curcumine est aussi dégradée à pH basique et neutre, à de hautes températures, à l'exposition à l'air libre et à la lumière, aux enzymes et à l'oxygène [220]. Les différentes voies de dégradation de la curcumine sont représentées dans la figure III.4 ainsi que les principaux produits de dégradation dans le tableau III.1.

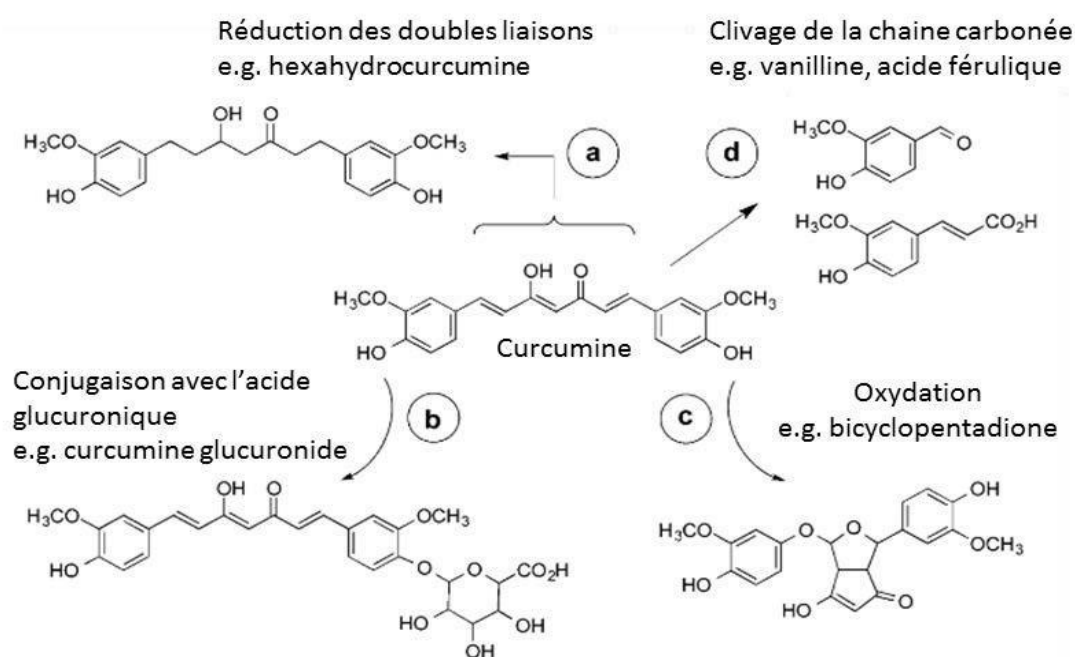
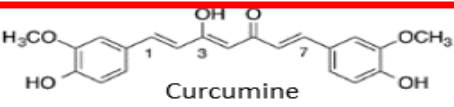
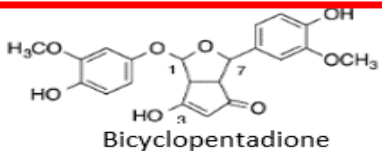
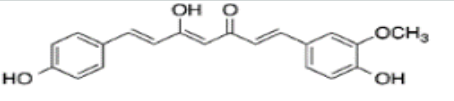
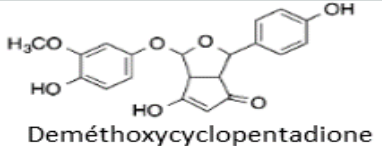
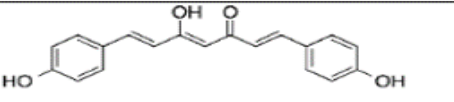
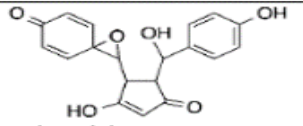
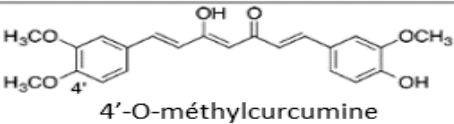
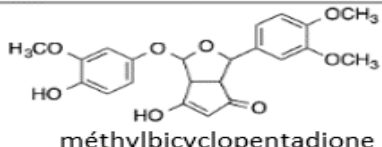
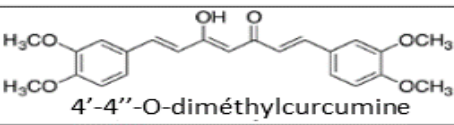


Figure III.3 : Les différentes voies de dégradation de la curcumine : (a) réduction, (b) conjugaison, (c) oxydation et (d) clivage [221].

Tableau III.1 : Les structures de la curcumine, de ces analogues et des principaux dérivés de l'auto-oxydation [221].

Composé et structure	Auto-oxydation $t_{1/2}$	Produit principal
 <p>Curcumine</p>	Rapide (minutes)	 <p>Bicyclopentadione</p>
 <p>Deméthoxycurcumine (DMC)</p>	Lente (heures/jours)	 <p>Deméthoxycyclopentadione</p>
 <p>Bisdeméthoxycurcumine (BDMC)</p>	Stable, nécessite une oxydation chimique ou enzymatique)	 <p>Bisdeméthoxyspiroepoxide</p>
 <p>4'-O-méthylcurcumine</p>	Lente (heures/jours)	 <p>méthylbicyclopentadione</p>
 <p>4'-4''-O-diméthylcurcumine</p>	Stable	ND

III .5. Propriétés physico-chimiques de la curcumine

La curcumine est un composé complexe constitué par des fonctions chimiques pouvant évoluer en fonction de l'environnement direct, de la présence de différents types de solvants, de la température et de la présence de lumière. Cette complexité confère à la curcumine une large collection d'interactions possibles qui multiplie le nombre de cibles moléculaires potentielles. A pH neutre et acide, la curcumine se comporte comme un donneur de proton et à pH basique comme un donneur d'électron, à l'origine de ses propriétés anti-oxydantes. La curcumine est insoluble dans l'eau, instable à pH basique, présente un poids moléculaire de 368,37 Da et un point de fusion de 183°C [222].

III .5.1. Solubilité de la curcumine

La curcumine est presque insoluble dans l'eau (0,6 µg/mL) [223] et l'éther, mais soluble dans l'éthanol, le méthanol, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'acide acétique glacial (index Merck). Le solvant DMSO est très utilisé pour les évaluations biologiques de la

curcumine et possède des propriétés de solvations exceptionnelles. La curcumine a une couleur jaune-orange pour un pH compris entre 2,5 et 7 et rouge à pH supérieur à 7.8.

Pour améliorer la solubilité de la curcumine dans l'eau, certains chercheurs ont fait l'expérience d'augmenter le pH du milieu aqueux. Cela se traduit par une dégradation et la formation d'ions phénolates par solvolysse.

En conditions physiologiques, il existe un équilibre entre une forme énolique et une forme dicétonique. Cette propriété de la curcumine peut être d'une importance cruciale dans la détermination de la sélectivité de sa liaison aux protéines, y compris à la protéine amyloïde β (1-42) dans les modèles de la maladie d'Alzheimer [224].

III .5.2. Spectre d'absorption UV de la curcumine

Le maximum d'absorption de la curcumine au spectrophotomètre UV a lieu à 430 nm dans le méthanol et entre 415 et 420 nm dans l'acétone. Les spectres consistent en des bandes larges, spécifiques, comme dans l'acétonitrile et l'éthanol. Une solution de curcumine à 1 % à une absorbance de 1650 unités d'absorbance [225].

Le spectre de fluorescence de la curcumine dans le toluène ($\lambda_{\max} = 460, 488$ nm) disparaît dans les solvants plus polaires et prend la forme d'une large bande dans l'acétonitrile ($\lambda_{\max} = 524$ nm) et l'éthanol ($\lambda_{\max} = 549$ nm).

III .5.3. Stabilité de la curcumine

La stabilité de la curcumine est essentielle à la conservation de son activité pharmacologique. La connaissance de cette stabilité aide les scientifiques à optimiser la formulation galénique nécessaire pour obtenir une biodisponibilité suffisante et limite la toxicité occasionnée par les produits de dégradation ou de métabolisme [213].

La curcumine est stable à pH acide (estomac), mais pas à pH neutre ou alcalin. Dans des conditions physiologiques *in vitro* (tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,2). Arrieta et al., (1988) [226] ont démontré que la curcumine est dégradée à plus de 90 % en 30 minutes en féruloylméthane par des mécanismes étudiés.

À pH=10,8, la demi-vie de la curcumine est d'environ une minute [227]. La tétrahydrocurcumine, un des principaux métabolites de la curcumine, est à l'inverse de cette dernière, assez stable en milieu neutre ou alcalin et garde ses propriétés antioxydantes.

Lorsque la curcumine est exposée à la lumière UV-visible, elle se décompose tant en solution qu'à l'état solide. La coloration des vêtements teints traditionnellement avec du curcuma s'atténue d'ailleurs au soleil [227].

III .6. Propriétés pharmacocinétiques de la curcumine

La curcumine présente des effets pharmacologiques très variés, notamment anti-inflammatoire, antioxydant et antiprolifératif etc.... Des essais cliniques de phase I montrent que la biodisponibilité de la curcumine est mauvaise. Même à de fortes doses (12 g / jour), la concentration plasmatique n'est que limitée chez les patients. Les principales raisons qui contribuent à une faible concentration plasmatique et au bas niveau de curcumine dans les tissus après administration par voie orale semblent être une mauvaise absorption, une métabolisation rapide, et aussi une élimination rapide [228]. Les paragraphes suivants résument les quatre processus pharmacocinétiques pour différentes voies d'administration.

III .6.1. Par voie orale

a. Absorption

Les études réalisées sur la curcumine ont montré que son administration orale aboutit à des concentrations sériques extrêmement réduites. En effet, la biodisponibilité de la curcumine par voie orale est faible : elle est peu absorbée par le tractus digestif et une grande partie de la dose administrée (environ 40 à 75 %) est excrétée dans les fèces, 35 % environ sous forme inchangée, 65 % sous forme de métabolites, majoritairement inactifs.

De façon à comparer les concentrations sériques maximales obtenues, la curcumine a été administrée chez le rat à la dose de 2 g.kg⁻¹ et chez l'homme à moindre dose : 33 mg.kg⁻¹ soit une dose de charge de 2g pour un adulte de 60 kg. Chez le rat, le pic est de 1,35±0,23 µg/mL et est atteint rapidement (50 min). Chez l'homme, la concentration sérique reste quasiment indétectable ou extrêmement faible (0,006±0,005 µg/mL à T_{max}= 1h). Compte tenu de ces résultats, qu'il faut bien entendu croiser avec les données d'activité pharmacologique de la curcumine, on peut affirmer que la curcumine possède une absorption médiocre même à forte dose. Cette faible absorption concourt à faire de la curcumine un composé difficilement biodisponible par voie orale chez l'homme et inconvenante en de trop fortes quantités [229].

b. Distribution

La distribution tissulaire de la curcumine est un paramètre assez peu exploré en raison des problèmes d'absorption. Les doses orales de curcumine requises pour obtenir des concentrations suffisantes à l'activité pharmacologique en dehors du tractus gastro-intestinal ne semblent pas atteignables chez l'homme avec l'administration de gélules de poudre. Pourtant, chez l'animal, des effets en dehors du tube digestif ont été mis en évidence à des doses de curcumine inférieures à celles permettant de la détecter dans les organes.

On ignore encore si ces effets peuvent être dus à d'autres composés que la curcumine, à des métabolites actifs inconnus, à des composés de dégradation, à des facteurs de l'environnement local potentialisant l'effet de la curcumine [230]. Dans la mesure où la curcumine possède des activités intéressantes pour les maladies neurodégénératives, sa distribution tissulaire cérébrale est également médiocre.

c. Métabolisation

Une fois absorbée, la curcumine va être très rapidement métabolisée, *via* des mécanismes de conjugaison, en glucuronoconjugué et en sulfate. Ces modifications sont réalisées par des UDP-glucuronosyl transférases et des sulfonyl transférases dans le but de rendre la curcumine moins lipophile afin qu'elle soit éliminée plus rapidement. Le foie est l'organe principal dans lequel se déroulent ces réactions. Le fait d'être métabolisé rapidement au niveau du foie est une étape subie par certaines substances absorbées par voie orale. On dit que la curcumine subit un fort « effet de premier passage hépatique ». Lors d'une étude sur sa métabolisation, la curcumine a été administrée oralement à des rats à la dose de 500 mg/kg. Dans de telles conditions, de petites quantités de curcumine, d'hexahydrocurcumine et de glucurono-hexahydrocurcumine, ainsi que des quantités plus importantes de glucurono-curcumine et de sulfo-curcumine sont retrouvées dans le plasma [231].

d. Élimination

L'élimination d'un composé est appréciée par le calcul de la demi-vie qui correspond au temps qu'il faut à l'organisme pour éliminer la moitié de la quantité de médicament parvenue jusqu'au compartiment plasmatique ou pour atteindre la moitié de la concentration maximale. La curcumine administrée par voie orale chez l'animal ou l'homme est majoritairement excrétée dans les fèces sous forme inchangée. L'excrétion urinaire a lieu sous forme de glucurono- et sulfo-conjugués.

Une étude a relevé des demi-vies d'absorption et d'élimination pour une dose de 2 g/kg administrée par voie orale chez le rat et l'homme de $0,31 \pm 0,07$ h et $1,7 \pm 0,5$ h, respectivement. Les taux de curcumine absorbée sont si faibles qu'ils n'ont pas produit de données exploitables pour le calcul des caractéristiques d'élimination de la curcumine. La demi-vie d'élimination n'est pas significativement différente pour des doses plus faibles, ce qui indique qu'elle est indépendante de la dose administrée. Une autre étude, postérieure, rapporte une demi-vie d'élimination plus longue après administration orale de 500 mg/kg de curcumine ($44,5 \pm 7$ h), mais la littérature existante n'est pas encore suffisante pour déterminer quels sont les facteurs contrôlant la demi-vie d'élimination *in vivo* [232].

III.7. Avantages de la curcumine

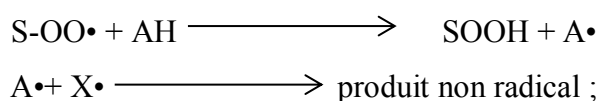
III.7.1. Activités biologiques de la curcumine

La structure chimique de la curcumine joue un rôle essentiel dans son activité biologique et sa biodisponibilité. La curcumine possède une large gamme d'activités pharmacologiques y compris des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses et antidiabétique. Le mécanisme d'action est complexe et probablement multifactoriel.

a) Activité antioxydante

La curcumine est un bon antioxydant et inhibe la peroxydation lipidique qui joue un rôle important dans l'inflammation, les maladies cardiovasculaires et le cancer. Il a été démontré que la curcumine est dix fois plus antioxydante que la vitamine E. Aussi, la curcumine agit comme un piègeur de radicaux libres [233]. Tout d'abord, l'effet de la curcumine sur la peroxydation lipidique a été étudié par plusieurs auteurs et sur des modèles variés. De plus, l'activité antioxydante de la curcumine est médiée par des enzymes antioxydantes telles que le superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase [234]. La curcumine est un accepteur dans la réaction de Michael, ce qui lui permet de réagir avec le glutathion et la thioredoxine. La réaction de la curcumine avec ces composés réduit le glutathion intracellulaire dans les cellules.

Le mécanisme antioxydant de la curcumine est attribué à sa structure, incluant les phénols méthoxylés et la forme énole de la β -dicétone. Le processus antioxydant non enzymatique se fait en deux étapes :



où S : est la substance oxydée, AH : l'antioxydant phénolique, A \cdot : le radical antioxydant et X \cdot : un autre radical. A \cdot et X \cdot se recombinent pour former un produit non radical [235].

b) Activité anti-inflammatoire

L'action anti-inflammatoire de la curcumine, connue depuis des millénaires, est basée au niveau moléculaire sur ses effets inhibiteurs vis-à-vis de la COX-2, des LOX, de l'iNOS et de la production de cytokines (figure III.5). Du point de vue clinique, la curcumine a montré ses effets anti-inflammatoires chez l'homme par voie orale (doses de 375 à 1200 mg/jour) en situation post-opératoire, dans la prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde [236].

Les effets antioxydant et anti-inflammatoire trouvent des applications dans les traitements de nombreuses affections [237].

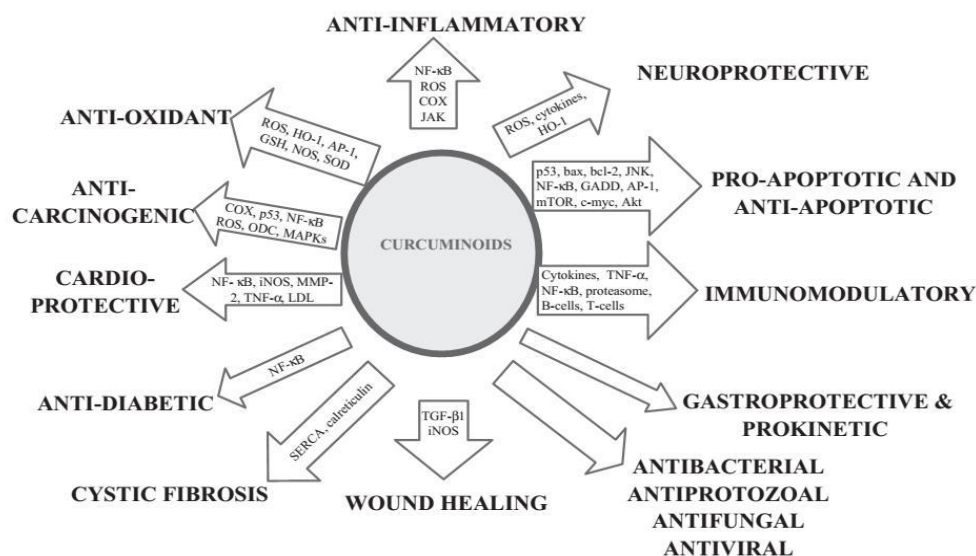


Figure III.4 : Mode d'Action des Curcuminoïdes.

c) Activité anticancéreuse

La curcumine peut aussi supprimer l'activité tumorigénique d'une large variété de carcinogènes, notamment responsables des cancers du côlon, duodénum, œsophage, aérodigestif, foie, sein, buccaux et prostate [238].

Plusieurs études indiquent que la curcumine est un puissant agent anti-cancer. Elle inhibe la croissance de cellules cancéreuses variées ; les tumorigenèses de la glande mammaire, de la cavité orale, des voies aérodigestives, de l'oesophage, de l'estomac, de l'intestin, du colon, du poumon et du foie ont été stoppés par cette dernière [238].

d) Activité antidiabétique

Les rapports d'études expérimentales prouvent également l'efficacité du curcuma pour le diabète [239]. La curcumine s'est révélée capable de diminuer les complications du diabète sucré. Une étude expérimentale sur l'efficacité du curcuma sur la glycémie chez des rats albinos a montré que le curcuma et la curcumine réduisaient le taux de sucre dans le diabète induit par l'alloxane. Le curcuma était célèbre pour sa propriété antidiabétique.

Le rapport suggère que l'action antidiabétique du curcuma peut être principalement à travers la vitalisation des cellules pancréatiques et par la stimulation de la production d'insuline. On a trouvé que l'extrait éthanoïque de curcuma abaissait le niveau de glucose sanguin lorsqu'il était injecté à des rats expérimentaux. L'effet abaissant était de 37,2% après 3 heures et de 59,5% après 6 heures. L'huile essentielle de *Curcuma longa* et son composant principal,

l'ar-turmérone, sont capables d'inhiber significativement l'activité de l' α -glucosidase et de l' α -amylase, des enzymes clés liées au diabète de type 2 [240].

III. 8. Inconvénients de la curcumine

La curcumine présente l'inconvénient majeur d'avoir une faible résorption intestinale après administration orale, et donc une faible biodisponibilité systémique, ainsi qu'une métabolisation systémique importante. Cela est sans doute dû au fait qu'il s'agit d'une molécule quasiment insoluble dans l'eau et qu'elle est rapidement métabolisée, conjuguée dans le foie et éliminée. Les métabolites formés sont la dihydrocurcumine et la tétrahydrocurcumine qui sont ensuite transformés en conjugués glucuronides. De plus la curcumine ne possède pas les propriétés physico-chimiques nécessaires pour le développement d'un médicament, rendant son usage thérapeutique limité. C'est pourquoi les chercheurs investiguent les bénéfices de complexer la curcumine avec d'autres molécules pour augmenter sa biodisponibilité [214,241].

III. 9. Les cyclodextrines

III. 9.1. Définition, structure et utilité

Les cyclodextrines (CD) sont des molécules-cage ou cages moléculaires d'origine naturelle qui permettent d'encapsuler diverses molécules à caractère hydrophobe [242]. Ce sont des oligomères cycliques composés de n chaînes de glucopyranose liés en α -(1,4). Trois familles sont principalement utilisées ou étudiées les α -, β - et γ -cyclodextrines formées respectivement de 6, 7 et 8 chaînes $C_6H_{10}O_5$ [243]. (Figure III.6).

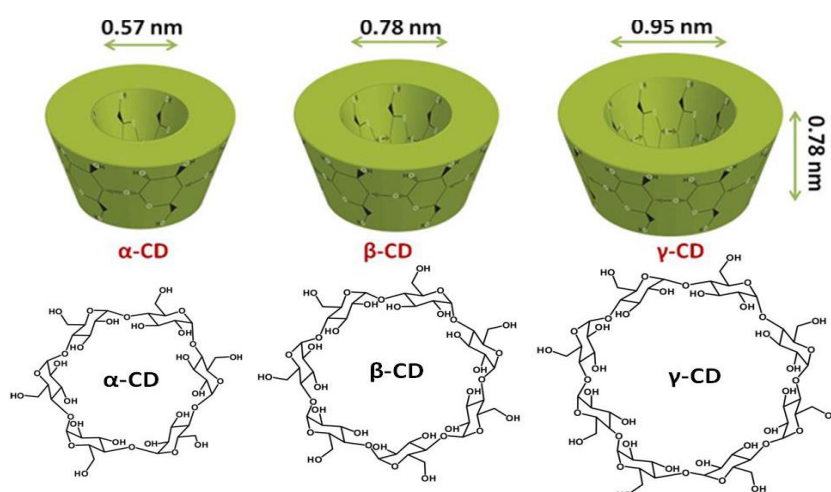


Figure III.5 : Les structures des trois familles principales de cyclodextrines classées selon le nombre d'unités de glucose présentes : α -, β - γ - CDs (avec 6, 7, 8 unités de glucose respectivement) [244].

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques avec une surface externe hydrophile et une cavité centrale lipophile permettant de réaliser des complexes d'inclusion avec des molécules peu solubles dans l'eau, possèdent une structure en tronc de cône, délimitant une cavité en leur centre. Cette cavité présente un environnement carboné apolaire et plutôt hydrophobe (squelette carboné et oxygène en liaison éther), capable d'accueillir des molécules peu hydrosolubles, tandis que l'extérieur du tore présente de nombreux groupements hydroxyles, conduisant à une bonne solubilité des cyclodextrines en milieu aqueux. Grâce à cette cavité apolaire, les cyclodextrines sont capables de former des complexes d'inclusion en milieu aqueux avec une grande variété de molécules-incorporées hydrophobes [245]. Une ou plusieurs molécules peuvent être encapsulées dans une, deux ou trois cyclodextrines (figure III.7).

La formation de complexes d'inclusion peut se faire avec des molécules liquides, solides ou gazeuses. La formation de complexe suppose une bonne adéquation entre la taille de la molécule à incorporer et celle de la cyclodextrine. Les liaisons hydrogène et de Van der Waals ainsi que les interactions hydrophobes facilitent la formation de complexes stables entre la cavité hydrophobe apolaire de la CD et les molécules peu hydrophiles [246]. L'intérieur de la cavité apporte un micro-environnement lipophile dans lequel peuvent se placer des molécules non polaires. Des CD ont été utilisées comme agents d'encapsulation à diverses fins telles que la stabilisation d'arômes [247,248] et des vitamines [249]. L'inclusion des polyphénols tels que le resvératrol [250], la quercétine [251] et la curcumine [252] dans les CD leur permet d'atteindre des concentrations plus élevées dans les solutions aqueuses et protège leur activité antioxydante de l'oxydation.

Les CD peuvent constituer avec les nanoparticules lipidiques solides des matrices d'encapsulation mixtes permettant par exemple d'améliorer la stabilité et la résistance de la curcumine face à l'oxydation [253].

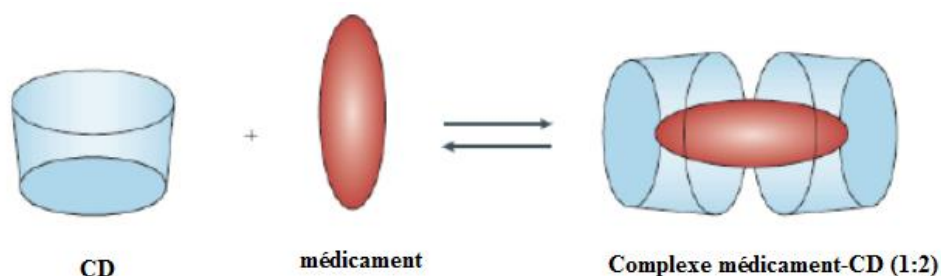


Figure III.6 : Représentation schématique de l'association d'une cyclodextrine libre (CD) avec une molécule (médicament) pour former un complexe molécule-cyclodextrine (1:2) (complexe médicament-CD) [254].

Les β -cyclodextrines (β -CD) sont largement appliquées dans les sciences pharmaceutiques pour améliorer la solubilité et la stabilité de principes actifs (protection contre l'oxydation, les UV, la chaleur,...), améliorer les mécanismes de dissolution des molécules actives ainsi que pour leur compatibilité biologique. Elles augmentent également le passage de molécules à travers les biomembranes. Leurs nombreuses propriétés font qu'elles sont également utilisées dans d'autres domaines comme l'industrie cosmétique et alimentaire.

III.10. Mécanismes de libération par gonflement suivi d'une diffusion

La compréhension des mécanismes de gonflement des polymères dans l'organisme est importante pour permettre de concevoir le système particulier de libération contrôlée et permet d'expliquer les comportements cinétiques de libération. Le principe actif est dissout ou dispersé au sein d'une matrice polymérique biocompatible.

Le polymère ne subit aucune modification chimique, il n'est pas dégradé, l'eau diffuse simplement à l'intérieur du réseau polymère, le gonfle, ce qui permet aux médicaments piégés à l'intérieur de se libérer.

III.10.1. Les facteurs influençant la libération d'un principe actif à partir des matrices hydrophiles

De nombreux facteurs peuvent influencer la vitesse et le mécanisme de libération d'une substance active à partir d'une matrice hydrophile. Ces facteurs concernent la substance active (solubilité, masse moléculaire, pourcentage dans la matrice (charge), taille des particules, etc.), le polymère (type de polymère, masse moléculaire, fonctionnalisation, viscosité, pourcentage dans la matrice, taille des particules, mélange des polymères, etc.), le milieu de dissolution (pH, force ionique, etc.) et la formulation (teneur en eau, processus de fabrication, caractéristiques des comprimés, etc.) [255].

III.10.2. Cinétiques de libération d'un principe actif

Le système idéal voudrait que l'on obtient une cinétique de libération d'ordre zéro. Or ce n'est pratiquement jamais le cas car les conditions de diffusion varient généralement au cours du temps avec l'apparition de phénomènes d'érosion, de gonflement ou la création de canaux engendrés par la dissolution progressive du principe actif à l'intérieur de la matrice ou à la surface de l'enrobage [256].

Lorsque la quantité de l'agent actif diffusant à travers la matrice est directement proportionnelle au gradient de concentration, la libération est régie par un ordre 1. Si la diffusion devient indépendante du gradient de concentration, la cinétique peut évoluer vers un

Ordre 0. Lorsqu'apparaissent les phénomènes de relaxation liés à l'érosion et/ou au démantèlement des chaînes de polymère, la libération est régie par une loi exponentielle non-Fickienne [257].

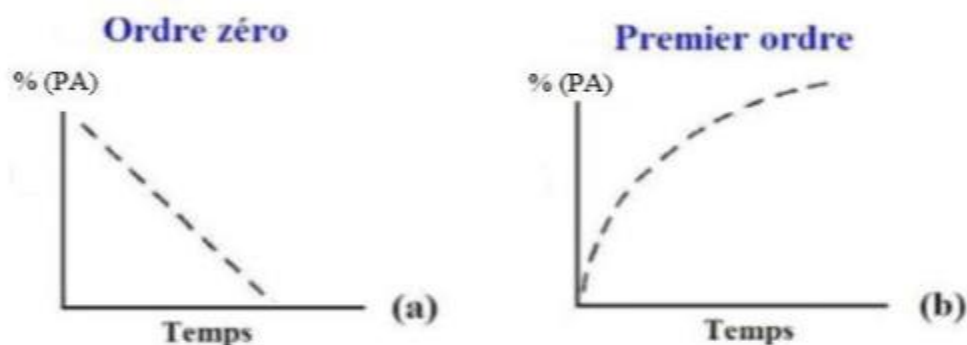


Figure III.7 : Cinétiques de libération d'ordre 0 (a) et d'ordre 1 (b) après administration orale d'une forme à libération prolongée.

Notre travail a porté sur la réalisation de systèmes d'hydrogels. Dans ce type de systèmes, la libération est souvent contrôlée par une étape d'ordre diffusionnel suivant les lois fondamentales de Fick portant sur la diffusion de la matière.

III.11. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons fait une étude bibliographique sur la curcumine, β -cyclodextrines et leurs descriptions, taxonomie, propriétés pharmacologiques (activité antioxydante, anti-inflammatoire et antidiabétique ...etc) et ainsi leurs utilisations dans différents domaines telle que le domaine alimentaire, corrosion, médecine et pharmaceutique ...etc. La biodisponibilité médiocre de la curcumine explique qu'elle ne soit pas très utilisée en biomédical de nos jours, mais encourage la recherche de solutions toujours plus innovantes pour la rendre efficace. Pour résoudre ce problème, la conception de complexe d'inclusion de la (β -cyclodextrines /curcumine) est une manière parmi celles existantes de promouvoir ses effets protecteurs en améliorant sa biodisponibilité. C'est une partie d'objet de notre thèse qui m'a été confiés. Elle consiste en l'obtention des films hydrogels encapsulés par le complexe d'inclusion curcumine, reproduisant ses effets antioxydants, mais en outre dépourvus de cytotoxicité et davantage biodisponibles.

Partie

expérimentale

Chapitre IV

IV.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à la synthèse des séries de films hydrogels biocompatibles en utilisant le chitosane (CS), lactalbumine (LA) avec différents taux de carboxyméthylcellulose oxydée (CMCOx) en différents rapports molaires, par une réticulation covalente. Tous les films hydrogels obtenus vont être testés afin de choisir celles qui présentent les meilleures performances.

A cet effet, on devrait passer initialement par le choix de matériel et des solvants les plus appropriés, la préparation des polymères à utiliser, ainsi que l'obtention de la fonction aldéhyde de CMCOx par l'oxydation chimique du CMC. Dans ce qui suit nous allons présenter quelques techniques qui fournissent les conditions de formation des films à caractère hydrogels, ainsi que les paramètres de travail de ces processus.

L'objectif principal de ce travail expérimental était d'optimiser les conditions de réaction pour obtenir des films d'hydrogels à base de CS/CMCOx et CS/LA/CMCOx avec les meilleures caractéristiques physico-chimiques et de les utiliser comme systèmes de délivrance pour une libération contrôlée et prolongée de curcumine.

IV.2. Matériaux et réactifs utilisés

Carboxyméthylcellulose de sodium en poudre (CMC) (la masse molaire de l'unité structurale est 233,70 g/mol ; Son degré de substitution est 70%, la viscosité moyenne est de 400–800 cps).

Chitosane (CS) avec un degré de N-désacétylation de 75%, la masse molaire moyenne: 190-310 kDa , pKa=6,2 , la viscosité moyenne est de 200-800 cps.

Le périodate de sodium (NaIO₄, 99%) MM = 213,89 g/mol.

La curcumine (extrait de Curcuma Longa) (C₂₁H₂₀O₆) MM= 368,37 g/mol.

α-Lactalbumine ;

β-cyclodextrine (C₄₂H₇₀O₃₅) MM =1135 g/mol, la solubilité dans l'eau à 25°C est 18,5g/L. Sont fournis de chez Sigma-Aldrich. Tous les autres produits chimiques utilisés lors de la réalisation de ces études sont de grade analytique.

Les solvants utilisés :

L'acide chlorhydrique (HCl) (35-37%) MM= 36,5g/mol,

L'acide acétique glacial (CH₃COOH) (Nr. EC: 200-580-7) MM=60,05 g/mol,

L'acétone (C₃H₆O) (Nr. EC: 200-662-2) MM = 58,08 g/mol,

Le méthanol (CH_3OH) (Lot CDF 02) MM = 32,04 g/mol,

L'éthanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) de pureté 96% MM = 46 g/mol

Le diméthylsulfoxyde DMSO ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$) MM = 78,13 g/mol

Autres produits:

La ninhydrine (2,2-dihydroxyindan-1,3-dione) ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$) MM= 178,18 g/mol, DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$) MM=394,32 g/mol, hydroxyde de sodium de pureté 100% (NaOH) MM= 40g/mol, phosphate de sodium monobasique (NaH_2PO_4) MM= 119,98g/mol, phosphate disodique (Na_2HPO_4) MM= 141,96g/mol, l'iodure de potassium (KI) MM= 166g/mol, le thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) MM= 158g/mol, le carbonate de sodium (Na_2CO_3) MM= 106 g/mol, Amidon ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$)_n MM= 106 g/mol, bichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) MM= 294 g/mol, Tween80 ($\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$) MM= 1227,54 g/mol ; sont fournis par société chimique.

IV.3. Méthodes de modification chimique des polysaccharides

Au départ, nous avons soumis la carboxyméthylcellulose à la modification chimique par oxydation. On utilise le plus souvent pour ce but le periodate de sodium (NaIO_4) qui provoque des oxydations chimiosélectives des groupements dioles vicinales avec la formation de dialdéhydes par scission homolytique de la liaison entre les deux carbones vicinaux du motif du polysaccharide ($\text{C}_2\text{-C}_3$).

IV.3.1. Préparation de la carboxyméthylcellulose oxydée (CMCO)

L'oxydation de la carboxyméthylcellulose (CMC) par periodate de sodium (NaIO_4) est menée selon la méthode décrite par A. Kulikowska (2013) [258] avec légère modification. Nous devons mentionner que la CMCOx a été préparé d'une part à partir de la solubilisation complète d'une quantité calculée stoechiométriquement de 3g de NaIO_4 dans 20 mL d'eau bidistillée à une température ambiante pendant 30 min sous agitation magnétique à l'abri de la lumière dans du papier d'aluminium.

D'autre part, dans un bécher, 3g de CMC a été introduit dans 100 ml d'eau bidistillée à une température $T=80^\circ\text{C}$, pendant 60 min, jusqu'à l'obtention d'une solution limpide, c'est à dire solubilisation totale de la CMC qui nécessite un temps plus élevé et un chauffage qui peut atteindre 80°C . Après la solubilisation du polymère, la solution a été laissée à refroidir à 30°C .

La solution de NaIO_4 a été ensuite ajoutée goutte à goutte sur la solution de CMC à 30°C .

La réaction du mélange a été portée dans un ballon de 250 ml et on a immergé dans un bain-marie à une température contrôlée sous agitation magnétique (500 tr / min) et mis à l'abri de la lumière, à l'obscurité dans du papier d'aluminium afin d'éviter l'auto oxydation pendant les

périodes de temps de 2, 4 et 6 heures, respectivement (figure IV.1). Pour stopper la réaction, 130 mL d'éthanol ont été versés dans le contenu du ballon. En plus de son action inhibitrice de la réaction d'oxydation, l'éthanol favorise la gélification de la CMC [259]. Le produit obtenu qui est appelé dialdéhyde de carboxyméthylcellulose, a été précipité lorsque nous y avons ajouté de l'éthanol (à 4 °C) et le précipité a été filtré, isolé et récupéré par centrifugation (6 000 x g 5000 rot/min, 10 min), puis lavé plusieurs fois avec de l'éthanol et de l'eau distillée, et laissé sécher à l'air libre pendant 8h. La carboxyméthylcellulose oxydée formée (CMCOx) a été versée dans des boîtes de pétries en verre, ensuite, on a utilisé une pompe sous vide pour évaporer le liquide, et enfin, sécher à l'étuve à 40°C pendant 24 h afin d'obtenir une masse constante pour les mesures ultérieures.



Figure IV.1: Image du procédé d'oxydation du périodate, avec et sans couverture de papier d'aluminium.

IV.3.2. Détermination quantitative des groupes aldéhydes obtenus dans la CMCOx

Le protocole de travail a été réalisé et adapté selon la méthode décrite par Teotia [119] et McSweeny et al. [260] avec quelques modifications. La teneur en groupes aldéhyde dans la CMCOx a été déterminée indirectement en dosant le périodate de sodium résiduel dans un mélange réactionnel par le titrage iodométrique. Expérimentalement, 1 ml du produit de CMCOx a été ajouté sur 1 ml de solution de KI à 20% , puis mélangé avec 1 ml de HCl à 37% (Tout d'abord, la solution de CMCOx est acidifiée avec 1 ml HCl 37%, ensuite on ajoute une solution KI, c=20%. La solution est gardée à l'obscurité pour 15-20 min, avant d'effectuer le titration avec le $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.05 N). L' I_2 a été titré avec 0,05 N de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ jusqu'à ce que la couleur de la solution passe au jaune clair. Après cela, pour visualiser l' I_2 , 1 ml

de solution d'amidon avec une concentration de 1% a été ajoutée, et la couleur de la solution est devenue bleue. Il a été encore titré jusqu'à ce que la couleur devienne transparente, et l'I₂ n'existe plus dans la réaction. Lange a décrit précédemment les réactions de titrage iodométrique en 1961 [261]. Sur la base de ces réactions impliquées, la quantité de periodate de sodium qui n'a pas réagi dans la réaction d'oxydation, a été également déterminée (à base des réactions décrites par Lange pour la consommation d'un mole de NaIO₄ sont nécessaires 8 mole de Na₂S₂O₃). La quantité de NaIO₄ qui réagit a été calculée comme étant la différence par rapport à la quantité initiale de NaIO₄ ajoutée dans la réaction d'oxydation. Le nombre de moles de groupes aldéhyde peut être calculé, en considérant qu'une mole de NaIO₄ ayant réagi était nécessaire pour obtenir 2 moles de groupes aldéhyde dans la CMCO_x.

IV.3.3. Etude de la cinétique d'oxydation de CMC par la détermination du degré d'oxydation

3 g de CMC ont été solubilisés dans 100 ml d'eau bidistillée à 80 °C, puis la solution a été laissée à refroidir et la température diminuée à 30 °C ; ensuite 2 g de NaIO₄ dissous dans 20 ml d'eau bidistillée ajouté goutte à goutte sur la solution de polymère, sous une faible agitation. La réaction d'oxydation a été faite dans un ballon en verre hermétiquement fermé pendant 6 heures en utilisant un bain-marie à 30 °C et a été déroulée sous agitation magnétique à l'abri de la lumière à l'obscurité. Le ballon a été bien entouré dans du papier d'aluminium pour éviter l'influence de la lumière sur la réaction d'oxydation. Après chaque heure pendant jusqu'à 6 heures, 1 ml d'échantillon a été prélevé dans le milieu réactionnel et titré avec Na₂S₂O₃. Le degré d'oxydation a été calculé par l'équation suivante IV.1:

$$DO\% = \frac{Q_R}{Q_T} \times 100 \quad (\text{éq IV.1})$$

Où Q_R est la quantité de NaIO₄ qui a été réagi et Q_T est la quantité totale de NaIO₄ introduite dans la réaction.

IV.3.4. Détermination du poids moléculaire de CMC et CMCO par la méthode viscosimétrique

Les viscosités intrinsèques de CMC et de CMCO_x ont été déterminées selon différentes valeurs de concentrations prédéterminées de polymère (0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,35%, 0,4% et 0,5% m / v) dans une solution de NaCl à un rapport massique (polymère: NaCl = 1: 1) (par exemple pour une préparation de solution de polymère avec une concentration de 0,2%, 0,2 g de polymère a été dissous dans une solution de 100 ml de concentration de NaCl à

0,2%), en utilisant un viscosimètre capillaire de type Ubbelohde ($K = 0,00999$) à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le poids moléculaire viscosimétrique moyen (M_w) a été calculé à l'aide de l'équation IV.2 de Kuhn-Mark-Houwink:

$$[\eta] = K * M_w^{\alpha} \quad (\text{éq IV.2})$$

Où $K = 1,23 \times 10^{-3}$ et $\alpha = 0,91$, (pour la CMC initiale et la CMCOx)

α et K : constantes pour un système solvant/soluté donné.

$[\eta]$ représente la viscosité intrinsèque, et M_w est le poids moléculaire moyen qui a été déterminé par la méthode viscosimétrique.

$[\eta]$ a été déduire par l'équation de la représentation graphique de η_{red} en fonction de la concentration de la solution.

IV.4. Obtention du complexe d'inclusion de la curcumine dans le β -cyclodextrine

Le complexe d'inclusion entre β -cyclodextrine (β -CD) et la curcumine a été préparé en utilisant le procédé de malaxage [262]. Une masse de 3,4 g de β -CD a été dissoute dans 50 ml d'eau distillée à une température de 70°C pendant 30 min, puis 0,55 g de curcumine a été solubilisée dans 30 ml d'éthanol sous une moyenne agitation et un chauffage à $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min.

Dans un ballon de 200 ml, la solution de β -cyclodextrine a été versée, puis dans quelques minutes, la solution du curcumine a été introduite. La réaction d'inclusion entre β -CD et la curcumine d'un rapport (2:1) est hermétiquement fermée, se déroule à une température de 85°C , avec une agitation assez lente pendant une durée de 4,5 heures (voir la figure IV.2). Le mélange a été récupéré, puis centrifugé et séché dans un dessiccateur pendant 48 h, et la masse obtenue doit être pesée. Le rendement pour le complexe d'inclusion (β -CD /curcumine) était environ de 76,5%. La poudre a été stockée à la température ambiante.

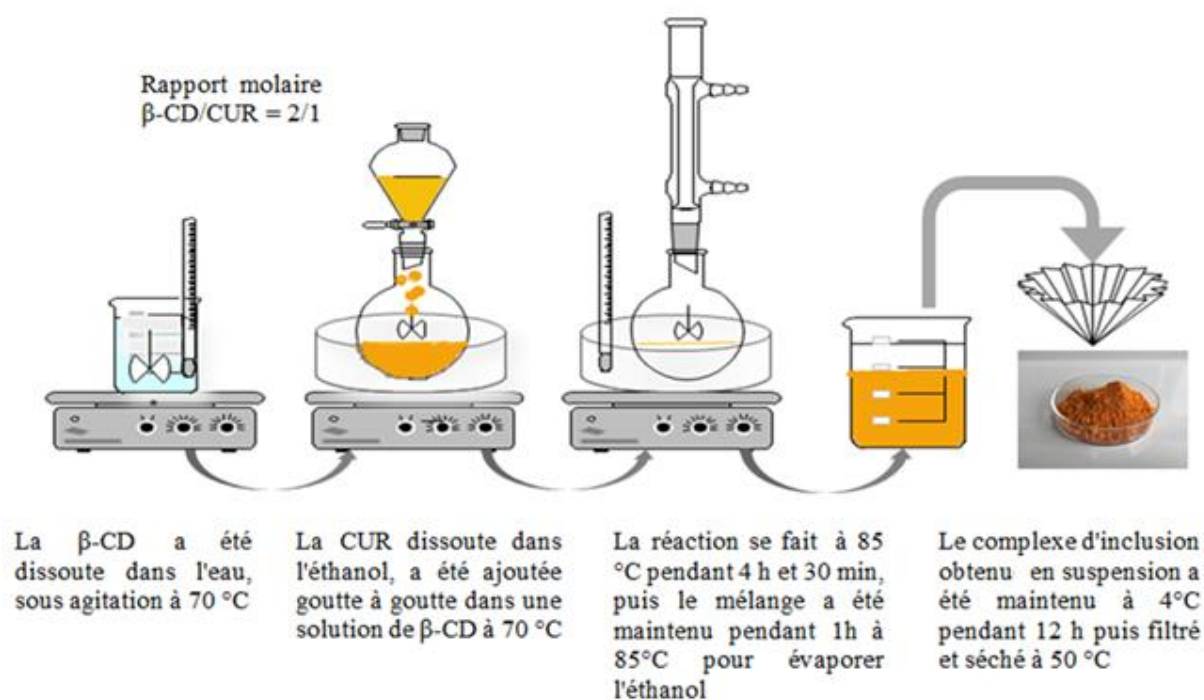


Figure IV.2 : Méthode expérimentale utilisée pour l'obtention du complexe d'inclusion de la curcumine avec la β -cyclodextrine à un rapport (2:1).

IV.5. Méthodes d'obtention des hydrogels

Les caractéristiques et les applications potentielles des hydrogels sont toujours corrélées avec leurs méthodes d'obtention. Les hydrogels peuvent être autant obtenus par des méthodes chimiques que physiques.

L'obtention des hydrogels à base de chitosane (CS) et de carboxyméthylcellulose oxydée (CMCOx) est basée sur le processus de la réticulation covalente par la réaction entre les groupes carbonyles comme les aldéhydes du CMCOx et les groupes amines libres de chitosane dans un milieu faiblement acide (comme l'acide acétique).

IV.5.1. Obtention des films à caractère d'hydrogels réticulés de manière covalente avec le chitosane (CS), lactalbumine (LA) et la carboxyméthylcellulose oxydé (CMCOx)

IV.5.1.1. Préparation des films hydrogels à base de CMCOx/CS

La préparation de films hydrogels se fait en solubilisant séparément sous faible agitation afin d'éviter la formation des bulles d'air, le chitosane (CS) et la carboxyméthylcellulose oxydée (CMCOx) à une température ambiante dans une solution acide pH=2,4. Le mélange de deux polymères a été maintenu à pH=2,4.

3 g de CS a été solubilisé dans 200 ml d'une solution d'acide acétique à pH = 2,4, et la solution a été maintenue sous agitation à température ambiante pendant 24 heures pour

assurer une homogénéisation du mélange. La solution de pH = 2,4 a été préparée en utilisant le NaCl (10 mM) et de l'acide acétique glacial pour ajuster le pH. Selon Caner et al. [69], l'acide acétique est le meilleur solvant pour obtenir des films d'hydrogel à base de CS avec des propriétés mécaniques et barrières optimales. Puis, on a centrifugé la solution du chitosane pour obtenir une solution homogène et limpide. La quantité de CS non dissoute résultante par la centrifugation a été séchée à 100 °C, puis nous l'avons pesé et la concentration de la solution a été ajustée à 1,5%. Différents rapports molaires entre les groupements amines de CS et les groupes aldéhydes de CMCOx ont été utilisés, en gardant une quantité constante de CS et en faisant varier la quantité de l'agent réticulant de CMCOx.

Le nombre de moles / g de chitosane a été déterminé par des calculs et son poids moléculaire de l'unité structurale était de 171,5 g / mol; cette valeur a été calculée sachant que le degré de désacétylation du chitosane était de 75%, et dans chaque unité structurale, il n'y a qu'un seul groupe amine. Le nombre de moles d'aldéhyde / g a été calculé en utilisant un titrage avec Na₂S₂O₃, comme décrit dans la section V.2.3 (matériel et méthodes).

Les rapports molaires de (-CHO / -NH₂) utilisés étaient: (0,25/ 1), (0,375/ 1), (0,5/ 1), (0,75/ 1), (1/ 1), (1,5/1) et (2/1) (mol / mol). Dans la seconde étape, 20 ml de la solution à 1,5% de CS préalablement préparée a été chauffé à 55 °C, puis, sous une moyenne agitation, une quantité requise calculée stoechiométriquement 5% (m/m) de CMCOx dissoute dans 10 ml de solution de pH = 2,4 a été ajoutée goutte à goutte.

La nouvelle solution ainsi préparée est introduite dans un flacon fermé et mise en agitation. La mixtion a été assurée par un agitateur magnétique à petite vitesse. L'opération dure en moyenne 2,5 heures, jusqu'à obtention d'une solution homogène. Une quantité de 0,3 g de glycérine (1% m / m, ce qui assure un rapport massique de 1 g de glycérine pour 100 g de solution de mélange de polymères) a été ajoutée à la solution de CS pour obtenir un film d'hydrogel flexible, incassable et sans fragilité avec de bonnes propriétés mécaniques, qui peut être appliqué sur la peau en assurant un bon contact avec celle-ci. La solution finale de polymères a été versée dans des boîtes de pétri de 9 cm de diamètre et séchée à la température ambiante. Après le séchage, les films obtenus ont été détachés soigneusement des boîtes de Pétri et conservés au réfrigérateur à 4 °C pour faire la caractérisation.

Le chitosane va précipiter et va former un gel réticulé avec la CMCOx, dû à l'élimination des forces électrostatiques répulsives entre les chaînes et à la création de liaisons covalente. La formation d'un lien imine est possible par réaction de Schiff entre un groupe amine de CS et l'aldéhyde du CMCOx. Le programme expérimental d'obtention de films d'hydrogel a été présenté dans le tableau V.1.

IV.5.1.2. Protocole d'inclusion de la curcumine dans les films à caractère d'hydrogel (CMCO_x/CS)

Pour effectuer l'encapsulation de la curcumine dans le film de chitosane /CMCO_x, 20 mg de curcumine a été dissous dans 15 ml d'alcool éthylique. Le film a été immergé dans cette solution de curcumine et a été maintenu pendant 24 heures à 45 °C pour l'évaporation de l'éthanol.

L'alcool entier a été évaporé, puis 20 ml supplémentaire d'éthanol a été ajouté pour dissoudre la curcumine qui reste à la surface du récipient. A cet effet, la curcumine restante sur la surface du film ; qui n'a pas été encapsulée, déjà a été éliminé en immergeant le film dans 25 ml de solution de PBS à pH = 7,4 pendant une minute. Après cela, le film a été séché à température ambiante.

IV.5.1.3. Préparation des films hydrogels à base de Chitosane/ α -LA / CMCO_x

La solubilisation de la protéine du α -lactalbumine a été effectuée à une T=30°C et par acidification à pH=2,9 avec du CH₃COOH (0,1M) , 50 mg de α -lactalbumine a été dissoute en 10 ml de la solution acide pH=2,9 sous une moyenne agitation pendant 45 min jusqu'à la dissolution totale du protéine.

Dans un bécher de 100 ml, un volume de 20 ml de la solution de chitosane (1.5%) a été introduit, puis 2% (m/m) de glycérine a été ajouté pour obtenir des films non cassables. La solution de α -lactalbumine a été versée goutte à goutte sur le mélange. La réaction s'est déroulée sous une très faible agitation afin d'éviter la formation de bulles d'air. Le chauffage a été ensuite mené jusqu'à 45°C pendant 60 min jusqu'à l'obtention d'une solution (CS/LA) transparente et ainsi homogène.

La réticulation covalente se fait directement par une agitation, en versant 6 mL de solution de l'agent réticulant CMCO_x goutte à goutte sur la solution du chitosane (CS/LA) à un rapport molaire moyen R (0.375 /1) par exemple de CMCO_x/CS (le volume versé dépend du rapport molaire). On ajoute doucement la CMCO_x pour éviter la précipitation du polymère. La réaction se fait sous une faible agitation à une température de 55°C pendant 3 h jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. La solution obtenue de (CS/LA/CMCO_x) se fait sous l'action des ultrasons pour éliminer les bulles d'air, ensuite la solution a été versée dans une boîte de Pétri en polystyrène (9 cm de diamètre) et a été laissée de sécher à l'air libre pendant 3 à 4 jours. L'épaisseur des films hydrogels après le séchage est environ 0,10 mm. Les films ainsi obtenus sont tamponnés avec du papier absorbant pour enlever la plupart d'eau, et on les détachés attentivement pour éviter toute déformation du film.

Après avoir expérimentalement maîtrisé la préparation des films hydrogels à base de chitosane (CS), α -lactalbumine (LA) et de carboxyméthycellulose oxydé (CMCOx), nous nous sommes intéressés dans un second temps à l'immobilisation du complexe curcumine dans les films préparés à base de CS/LA /CMCOx. Le complexe d'inclusion curcumine/ β -cyclodextrine pour les films chitosane/ α -LA/CMCOx a été directement inclus dans le film pendant son obtention.

IV.5.1.4. Immobilisation du complexe d'inclusion β -cyclodextrine /curcumine dans les films à base de CS/LA /CMCOx

Afin de montrer l'importance de la modification chimique, le complexe entre la β -cyclodextrine et la curcumine a été obtenu, puis séché et broyé pour obtenir un produit en poudre fine. L'inclusion de la curcumine dans la cavité de la cyclodextrine a pour but d'une amélioration de la solubilité du curcumine et de sa biodisponibilité.

Dans un petit bécher de 20 mL, une masse de 180 mg du complexe curcumine a été dispersée en 10 ml de la solution (éthanol/eau) à un rapport volumique (3/2) ; sous une agitation magnétique à une température de 65°C pendant 20 min jusqu'à la dissolution totale (20 mg curcumine se trouvent dans 180 mg complexe d'inclusion).

La solution du complexe d'inclusion obtenue a été ajoutée goutte à goutte sur la solution précédente préparée à base de CS/LA/CMCOx et que cette solution du β -CD/Cur a été incluse totalement dans le mélange de CS/LA/CMCOx. La réaction de l'immobilisation se fait sous une faible agitation magnétique à une température de 30 °C pendant 2,5h pour obtenir une solution homogène, et aussi pour assurer l'inclusion du complexe curcumine. La solution finale à base de (CS/LA/CMCOx/Complexe) est destinée à la sonication pour éliminer les bulles d'air, ensuite la solution a été versée dans une boîte de Pétri en polystyrène (9 cm de diamètre) et laissée sécher à l'air libre pendant 3 à 4 jours. (voir la figure IV.3). L'épaisseur des films hydrogels après le séchage est environ 0,20 mm. Les films ainsi obtenus ont été tamponnés avec du papier absorbant et on les retirés attentivement pour éviter toute déformation du film.

Le complexe final de CS/LA/CMCOx chargé de médicament a été obtenu par diffusion de la solution du complexe β -CD/Cur dans la matrice polymère. La quantité de curcumine incluse dans les films hydrogels est dispersée dans chaque mélange polymère après on a ajouté l'agent de réticulation. Les hydrogels obtenus sous forme des films confirment une bonne incorporation de médicament dans la matrice polymérique.

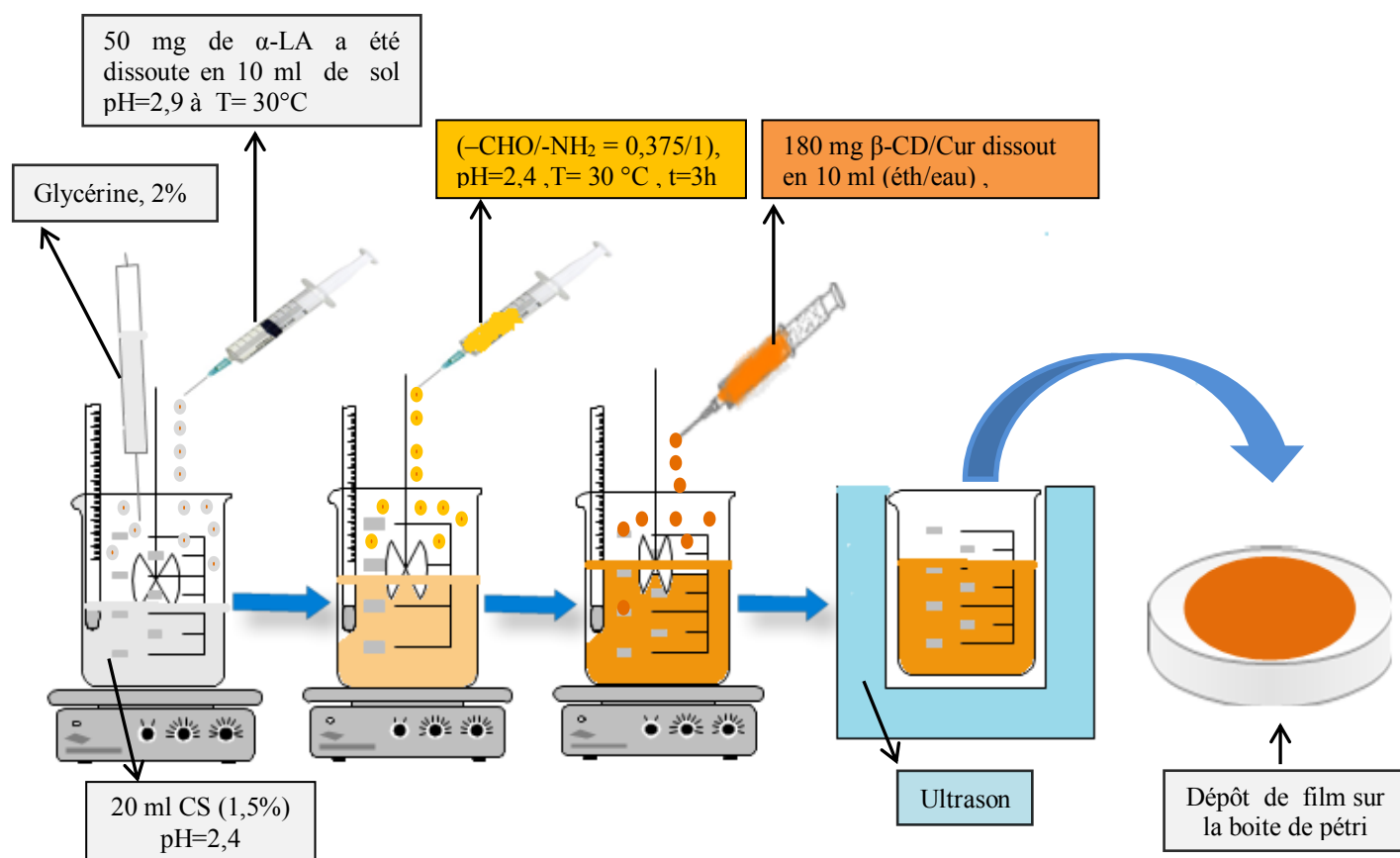


Figure IV.3 : Méthode expérimentale de préparation des films hydrogels à base de CS et LA réticulés avec la CMCOx chargés par le complexe d'inclusion.

IV.6. Méthodes de caractérisation physico-chimique des hydrogels

Les hydrogels obtenus ont été caractérisés par plusieurs techniques et méthodes d'investigation:

- Structurale (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrophotométrie UV-Vis)
- Morphologique (microscopie électronique à balayage (MEB))
- Propriétés thermiques (analyse thermogravimétrique (ATG))
- Propriétés mécanique (essai de traction)
- Propriétés physico-chimiques (détermination de la masse moléculaire, caractéristiques de gonflement en milieu aqueux, stabilité de la curcumine libre et immobilisée dans les films à la lumière, stabilité de la curcumine libre et immobilisée dans les films a pH, capacité de chargement des hydrogels avec du médicament / capacité de libération d'un médicament)
- Caractéristiques des biomatériaux (test de l'activité antioxydante).

IV.6.1. Méthodes spectrales (IR, RMN et UV)

IV.6.1.1. Spectrophotométrie infrarouge (FTIR)

La spectroscopie infrarouge (FTIR) (en anglais, Fourier Transform Infrared Spectroscopy), permet de révéler de façon qualitative la structure chimique d'un échantillon inconnu. Dans cette étude, les analyses FTIR ont été réalisées avec un appareil spectrophotomètre infrarouge à transformée de fourrier de type Bruker Vertex FT-IR avec ATR (figure IV.4) sur une plage de fréquences de 400 à 4000 cm^{-1} à une résolution de 4 cm^{-1} (les discussions ont été faites dans la section V.2.1 pour la CMC ou la CMCO_x, et dans la section V.4.1 pour les films à base de CS réticulé avec la CMCO_x). Les spectres FT-IR sont directement enregistrés à partir de CMCO_x et des films basés sur le CS réticulé avec CMCO_x qui ont été broyés sous forme de poudres et ensuite pressés sous forme de pastilles et mélangés avec le KBr.



Figure IV.4 : Appareil du spectrophotomètre infrarouge à transformée de fourrier de type Bruker Vertex FT-IR.

Cette analyse a été utilisée pour :

- Evaluer la modification chimique de la CMC en CMCO_x.
- Etudier la fonctionnalisation chimique du film CS/CMCO_x.

Toutes les analyses ont été effectuées à la température ambiante.

IV.6.1.2. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (¹H RMN et ¹³C RMN)

Les spectres ¹H RMN et ¹³C RMN ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre de type Bruker NEO 1-400 d'Allemagne (figure IV.5) fonctionnant à 500 MHz et à la température ambiante (298 K). La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire a été utilisée pour étudier la structure moléculaire du produit avant et après l'oxydation. Les échantillons ont été préparés en dissolvant la CMC dans l'eau deutérée à 80 °C et la CMCO_x a été dissoute dans

l'eau deutérée ou dans la DMSO. Les spectres analysés ont été enregistrés et traités avec un logiciel ACD Spec Manger.



Figure IV.5 : Appareil du spectrophotomètre RMN (Bruker NEO 1-400).

IV.6.1.3. Spectrophotométrie ultraviolet visible (UV-Vis)

La spectroscopie ultraviolet-visible est une méthode intéressante pour l'analyse qualitative et le suivi des réactions chimiques, cette technique de spectroscopie mettant en jeu des photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (200 nm–400 nm), du visible (400 nm–750 nm) et jusqu'au proche de l'infrarouge (750 nm -1400 nm). Soumises à un rayonnement dans cette gamme de longueurs d'ondes, les molécules subissent des transitions électroniques. Cette méthode d'analyse est largement utilisée pour étudier la taille et la polydispersité en taille des nanoparticules dans des solvants.

Dans cette étude, l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis de type UV-vis NanoDrop ND-1000 à double faisceau (figure IV.6).

A l'aide de la spectroscopie UV-vis, on a étudié l'inclusion et la cinétique de libération de la curcumine des différents films préparés dans deux milieux aqueux.



Figure IV.6: Appareil du spectrophotomètre UV-visible – NanoDrop ND-1000.

IV.6.2. Dosage des protéines totales (lactalbumine)

Les teneurs en protéines totales (lactalbumine) et des films à base de chitosane qui contient la protéine ont été dosées selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) [263] avec de légères modifications. Les protéines réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu (un mélange de tungstate et de molybdate de sodium en solution dans l'acide phosphorique et l'acide chlorhydrique) pour donner des complexes colorés. L'intensité de la coloration dépend donc de la quantité d'acides aminés aromatiques présents et varie selon les protéines. Les absorbances sont mesurées à 660 nm avec pour témoin une solution contenant tous les réactifs exceptées les protéines.

- **Réactif utilisés**

Réactif A : 150 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (2 %, m/v) préparé dans la soude 0,1N NaOH;

Réactif B : 150 ml de (2ml de sulfate de cuivre CuSO_4 (1 %, m/v) préparé dans de l'eau distillée + 2ml de tartrate double de sodium et de potassium ($\text{Na}^+ \text{Si K}^+$) (1%, m/v) préparé dans de l'eau distillée) ;

Réactif C : préparée extemporanément à partir de 100 ml réactif A et 2 ml réactif B ;

Solution D : réactif de Folin-Ciocalteu :

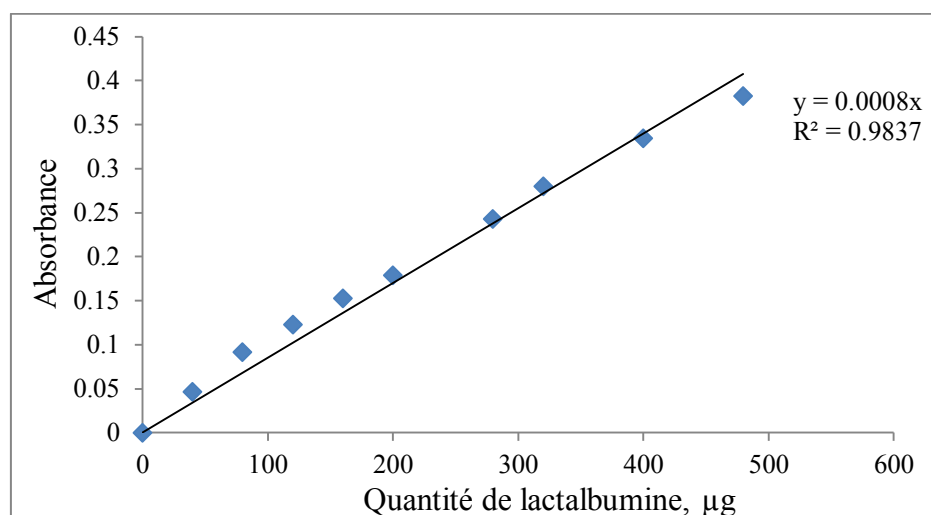
Technique de dosage

Différentes concentrations des solutions de chitosane et protéines ont été diluées dans des volumes bien déterminés de solution C (tableau IV.1). Ensuite, 900 μl de solution A ont été ajoutés à ces mélanges. Le milieu réactionnel a été agité et laissé reposer pendant 3 heures pour permettre le développement de la coloration.

L'absorbance de l'essai a été mesurée à 660 nm avec pour témoin une solution ne contenant pas les solutions préparées. La densité optique obtenue a été ensuite convertie en mg de protéine grâce à une droite d'étalonnage préparée dans les mêmes conditions dont la lactalbumine (80 mg/ ml) a été utilisée comme protéine de référence (tableau IV.1 et figure IV.7).

Tableau IV.1: Dosage des protéines totales de lactalbumine

Solutions (mg/ml)	Concentration lactalbumine (mg)	Réactif C (ml)	Réactif D (ml)
0.05	40	9.05	0.9
0.10	80	9	0.9
0.15	120	8.95	0.9
0.20	160	8.9	0.9
0.25	200	8.85	0.9
0.30	240	8.8	0.9
0.35	280	8.75	0.9
0.4	320	8.7	0.9
0.5	400	8.6	0.9
0.6	480	8.50	0.9

**Figure IV.7:** Courbe d'étalonnage $A = f(C)$ de la solution aqueuse de lactalbumine.

IV.6.3. Dosage des groupements amines libres de protéines de lactalbumine et de films avec le chitosane

Le dosage des groupements amines libres et aussi les groupements amines liées (dans les films) des protéines de lactalbumine avec le chitosane a été réalisé selon le test à la ninhydrine [264] avec de petites modifications. La réaction avec la ninhydrine (solution fraîchement préparée) s'effectue dans des tubes à essai contenant chacun les différentes concentrations des solutions des polysaccharides et protéines à tester, diluées au préalable à la solution acétate buffer pH=5.6, selon les conditions présentées au tableau IV.2, suivie d'une agitation au vortex puis chauffage au bain marie bouillant à 95°C pendant 30 min, ensuite

mélangées avec 8 ml d'une solution (éthanol-eau distillé) (V/V) suivie d'une agitation au vortex pour détruire l'excès d'hydrindantine. L'apparition de la coloration violette-bleue reflète la présence d'acides aminés. La densité optique de l'essai a été mesurée à 570 nm avec pour témoin une solution exempte des solutions préparées. La densité optique obtenue a été ensuite convertie en moles 10^{-3} des groupements amines libres par gramme de protéine.

Tableau IV.2: Dosage des groupements amines libres des protéines et des polysaccharides.

Solutions (mg/ml)	Ninhydrine (ml)	Buffer acétate pH 5.6 (ml)	éthanol-eau (V/V) (ml) (rapport 1 :1)
0.2	2	0.8	8
0.3	2	0.7	8
0.4	2	0.6	8
0.5	2	0.8	8
0.6	2	0.7	8
0.7	2	0.6	8
0.8	2	0.5	8

Pour évaluer le nombre de groupements amines libres du chitosane, tout d'abord, nous avons effectué le test de l'analyse ninhydrine pour les différentes concentrations et on a construit une courbe d'étalonnage. Les échantillons ont été préparés et soumis à l'analyse spectrophotométrique UV-Vis.

Le CS utilisé (poids moléculaire moyen) a un degré de désacétylation de 75%, et le poids moléculaire de l'unité structurale est de 171,5 g / mol. Une solution mère de CS d'une concentration de 0,1% (m/v) a été initialement préparée pour tracer la courbe d'étalonnage en dissolvant la quantité de CS dans une solution d'acide acétique à 0,1% (pH= 2.4). Différents volumes ont été prélevés pour préparer six concentrations différentes de CS (0,1, 0,2, 0,25, 0,30, 0.35 et 0.4 mg / ml) et ont été amenés en utilisant une solution tampon d'acétate pH = 5,6 dans des fioles jaugées de 10 ml.

Dans des tubes à essai, 1 ml de solution de CS a été ajouté à chaque concentration préalablement préparée, puis 2 ml de solution de ninhydrine à 2% dans l'éthanol ont été ajoutés. Ensuite, les échantillons ont été pesés et chauffés à 95 ° C pendant 30 minutes, et la couleur des solutions est devenue bleu foncé. Après refroidissement des solutions, 8 ml d'une solution d'éthanol/eau distillée (rapport en volume 1:1) ont été ajoutés. L'étalonnage du spectrophotomètre a été effectué avec 1 ml de solution tampon acétate à pH = 5,6 et 2 ml de solution de ninhydrine à (2% dans l'éthanol).

Les absorbances des solutions ont été enregistrées avec un spectrophotomètre UV-vis à une longueur d'onde de 570 nm. La courbe d'étalonnage (l'absorbance en fonction des groupements amines de chitosane) dans la solution de pH= 2.4 a été tracée et représentée par l'équation $y = 0,056x$ ainsi peut être observée dans la figure IV.8. Le test de la ninhydrine a été réalisé aussi pour des échantillons de CS réticulés avec CMCO_x.

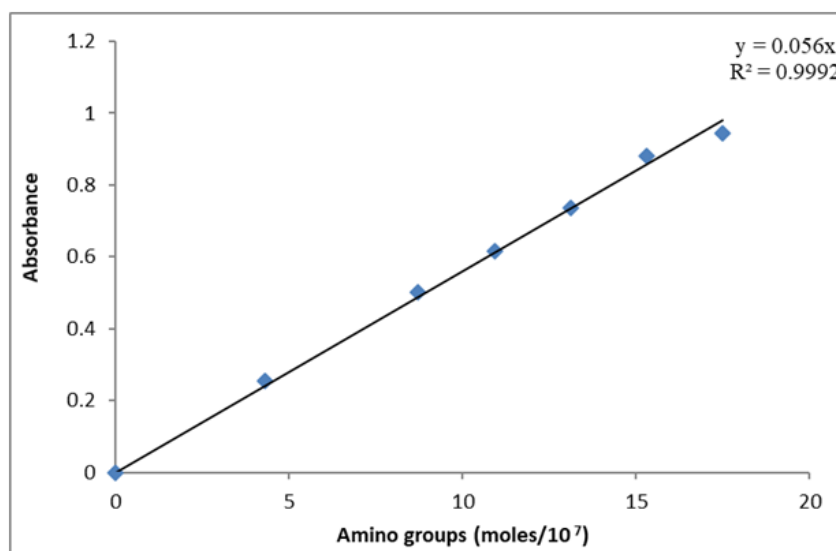


Figure IV.8 : Courbe d'étalonnage $A = f(C)$ de la solution aqueuse du chitosane.

IV.6.4. Méthode de détermination du DC_{amine} (%) des groupements amines dans les bases Schiff pour les films d'hydrogels obtenus

Le protocole de travail était similaire à celle présentée ci-dessus pour déterminer le nombre de groupes amines libres dans les films réticulés à base de CS et CMCO_x. Les films synthétisés ont été coupés principalement en petits morceaux et pesés à des masses bien déterminées et ont ensuite été placés dans les tubes à essai avec 1 ml de tampon acétate pH = 5,6 a été ajouté, ensuite le protocole de travail était le même que celui présenté précédemment.

Sur la base de la courbe d'étalonnage du chitosane précédemment tracée, les groupes amines libres dans les films d'hydrogel ont été déterminés. Le nombre total de groupes amines impliqués dans la formation des bases de Schiff, et aussi dans les interactions physiques fortes avec les groupes carboxyliques dans la CMCO_x peut être calculé par la différence entre le nombre total de moles de groupes amines libres initialement ajoutés dans la réaction (calculé sur la base de la quantité initiale de chitosane), et les groupes amines libres dans l'hydrogel déterminés en utilisant le test à la ninhydrine.

Le degré de conversion DC_{amine} des groupes amine en réaction aux groupes carbonyles des films à base de Schiff à un moment donné a été exprimé en (%) et calculé par l'équation IV.3 :

$$DC (\%) = \frac{N_b - N_a}{N_b} \times 100 \quad (\text{éq IV.3})$$

Où N_b : le nombre de moles de groupements amines initiales libres du chitosane avant la réticulation;

N_a : le nombre de moles de groupements amines libres du chitosane après la réticulation.

$N_b - N_a$: représentent le nombre des groupements amines $-NH_2$ du chitosane qui ont réagi et liés dans le film d'hydrogel jusqu'au moment t de la réaction.

L'influence de la température de réticulation, du temps de réticulation et du rapport molaire sur la valeur de DC_{amine} (%) a été étudiée. Le DC_{amine} de la détermination de groupements amines a été réalisé en triple. L'écart type était de $\pm 3\%$.

IV.6.5. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les films hydrogels ont été caractérisés par microscopie électronique à balayage (MEB) pour déterminer les morphologies de surface, la porosité et évaluer qualitativement l'étendue de la présence de films hydrogel à base de chitosane réticulé avec la CMCOx dans la matrice de polymère. Les échantillons des films hydrogels P1 (0.25/1) et P3 (0.5/1) ont été coupés puis séchés et métallisés avec l'or en utilisant un dispositif de dépôt par pulvérisation et analysés par un microscope électronique à balayage à émission de champ (Hitachi SU-1510, Hitachi Company, Japon) (figure IV.9).



Figure IV.9: Appareil de la microscopie électronique à balayage (MEB).

IV.6.6. Etude thermique

IV.6.6.1. Analyse thermogravimétrique (ATG)

La thermogravimétrie (ATG) mesure l'évolution de la masse d'un échantillon en fonction du temps ou de la température dans une atmosphère contrôlée. Cette technique est couramment utilisée pour connaître le comportement thermique des échantillons et caractériser la décomposition et la stabilité thermique des matériaux mais aussi pour étudier la cinétique de dégradation par un processus physicochimique.

L'analyse thermogravimétrique a été effectuée sur les polymères ainsi que les films hydrogels synthétisés dans le but d'observer la différence de stabilité thermique entre les différents rapports molaires ou de formes de films hydrogels analysés.

Les mesures thermogravimétriques (ATG) ont été réalisées à l'aide d'un analyseur TGA Instrument Q500 V20.10 à pression atmosphérique (100 ml /min), couvrant une gamme de température. Les échantillons ont été chauffés de la température ambiante de 25 jusqu'à 800°C avec une vitesse de chauffage appliquée de 10 °C / min en présence d'air. D'abord, les échantillons analysés ont été séchés dans un bassin constant et ont été conservés dans un dessiccateur. Les paramètres de fonctionnement ont été maintenus constants pendant toutes les expériences (figure IV.10).



Figure IV.10 : Appareil d'analyse thermogravimétrique de type TGA Instrument Q500.

IV.6.7. Tests mécaniques - Essais de traction

Les courbes contraintes-déformations qui ont été réalisées sur les trois films hydrogels sélectionnés à différents rapports molaires : P1 (0.25/1), P2 (0.375/1), P3 (0.5/1) et P4 (0.75/1) sont enregistrées. Le module de Young, la déformation et la contrainte à la rupture mis en jeu pour rompre l'échantillon sont aussi calculés pour les hydrogels examinés.

À l'état sec, les échantillons soumis au test ont été coupés sous forme d'éprouvettes rectangulaires, puis placés entre les deux mors de l'appareil. Le démarrage s'effectue automatiquement à une vitesse de 5 mm/min jusqu'à ce que la rupture de l'échantillon soit atteinte. A ce moment, la traverse s'arrête et la courbe force-allongement est alors enregistrée. L'essai est repris en trois fois.

IV.6.8. Détermination des caractéristiques de gonflement des films hydrogels

La détermination de la capacité de rétention de l'eau dans les films hydrogel obtenus, est quantifier généralement par le degré de gonflement ($Q_t, \%$). Cette caractéristique est importante car elle provoque une diffusion plus ou moins intense du principe actif à partir de la matrice hydrogel.

Les caractéristiques et la cinétique de gonflement dans l'eau des hydrogels obtenus (le degré maximum de gonflement et le taux d'eau de l'hydrogel à l'équilibre) ont été effectuées par gravimétrie dans deux solutions tampons 0,1M à pH=7,4 (PBS, simulant un pH de sang) et 0,1M à pH=5,5 (ABS, simulant un pH de peau) comme des agents gonflants. Pour cela les films hydrogels synthétisés ont été coupés en petits morceaux et pesés à des masses bien déterminés (M_0) et ont ensuite été placés dans une solution tampon de 5 ml de différentes valeurs de pH à 37 °C jusqu'à l'équilibre. Les mesures du poids avec précision se font en fonction du temps à la température ambiante. A des intervalles de temps consécutifs, l'échantillon a été retiré du milieu liquide et sa surface a été tamponnée avec du papier filtre pour enlever et éliminer l'eau absorbée en surface. La masse des films gonflants (M_t) a été déterminée par pesée. La solution absorbée par les films représente la différence entre le poids du film gonflé (M_t) et le poids du film sec (M_0). Après la pesée, les échantillons ont été réintroduits dans la solution tampon, et l'opération a été répétée après des intervalles de temps bien établis jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint.

Le degré de gonflement a été exprimé comme le rapport entre la quantité de solution retenue dans les films à chaque intervalle de temps mesuré et la quantité de film complètement sec, en utilisant l'équation IV.4 [265].

L'influence de la température de réticulation, du temps de réticulation et du rapport molaire sur les valeurs du degré de gonflement a été étudiée.

$$Q_t(\%) = \left(\frac{M_t - M_0}{M_0} \right) * 100\% \quad (\text{eq IV.4})$$

Avec Q_t : degré de gonflement en (%) ;

M_t : Masse du film gonflé dans le solvant pendant un temps t en (g) ;

M_0 : Masse initiale du film hydrogel sèche à (t=0) en (g).

Le degré de gonflement a été réalisé en triple. L'écart type était de $\pm 5\%$. Ce test a été évalué dans deux milieux pseudo-physiologiques et/ou *in vitro* dont les compositions sont les suivantes.

Solution 1:

C'est une solution tampon acétate pH=5,5 (ABS). Préparer une solution de dihydrogénophosphate de sodium (soit 9,08 g de NaH_2PO_4 par litre) et une solution de disodium hydrogénophosphate (9,47 g de Na_2HPO_4 par litre). 10 ml de Na_2HPO_4 mélangé avec 190 ml de NaH_2PO_4 et on ajuste le pH à 5,5.

Solution 2:

C'est une solution tampon phosphate pH=7,4 (PBS). La préparation commune est décrite selon Lihong et al. (2012) [266] comme suit :

Pour un litre d'une solution PBS utilisée, on additionne 9g de NaCl, 17,97g de Na_2HPO_4 , 5,73g de NaH_2PO_4 . On procède ensuite à leur dissolution en même temps dans 800 mL d'eau distillée. On ajuste alors le pH à 7,4 avec l'acide chlorhydrique (1N) ou NaOH (1N), et enfin, on complète avec de l'eau distillée à un litre.

IV.6.9. L'inclusion de la curcumine dans les films hydrogels**IV.6.9.1. Détermination de l'efficacité d'encapsulation de la curcumine dans les films de CS/CMCO_x**

L'inclusion de la curcumine dans les films hydrogels à base de CS/CMCO_x a été réalisée par diffusion et d'évaporation d'alcool. Une quantité de 20 mg de curcumine a été dissoute dans 15 ml d'éthanol sous une moyenne agitation, et les films obtenus précédemment ont été coupés en petits morceaux à des masses bien déterminées et ont ensuite été mis en suspension et immergés dans la solution de curcumine et maintenus pendant 24 heures à 45 °C pour l'évaporation de l'éthanol. Après 24 heures, les films secs ont été placés pendant 30 secondes dans 25 ml de solution tampon phosphate à pH = 7,4 pour éliminer la curcumine trouvée sur la surface du film qui n'a pas été immobilisée. Afin de déterminer la quantité de curcumine qui a été immobilisée aux films, 20 ml d'éthanol a été ajouté au récipient (la solution de curcumine) dans lequel l'encapsulation de la curcumine a eu lieu. A partir de la quantité initiale de curcumine, la quantité de curcumine contenue dans le surnageant (extraite dans l'éthanol) a été abaissée et la quantité exacte de composé trouvée dans les films hydrogels analysés a été déterminée. La concentration du médicament testé dans la solution initiale a été mesurée par spectroscopie UV en utilisant un nanodrop1000 UV à une longueur d'onde d'absorption de 425 nm à partir de la solution aqueuse contenant de la curcumine.

Avant de procéder au suivi la cinétique de libération de la curcumine, nous avons au départ tracé la courbe d'étalonnage de la curcumine dans l'éthanol, $A = f(C)$, qui peut être observée dans la figure IV.11. La relation de linéarité et l'équation de la régression peuvent s'observer au-dessus de la courbe.

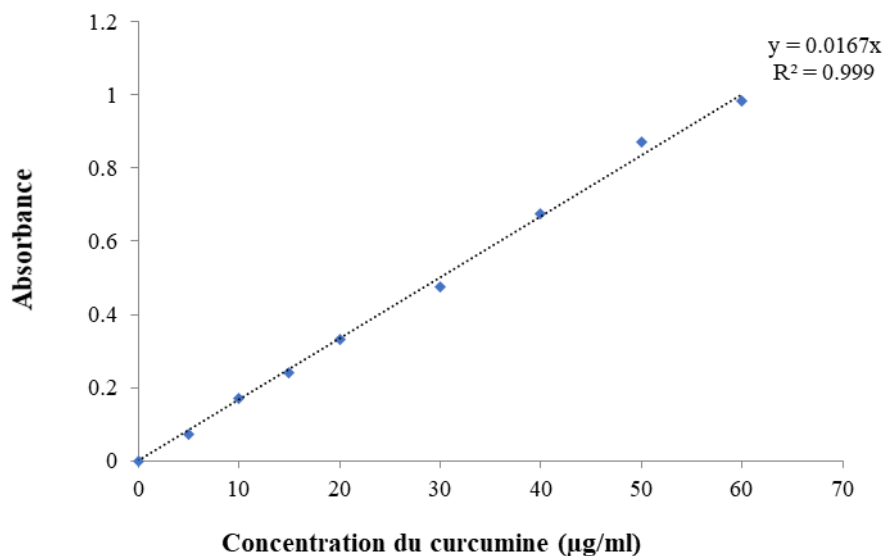


Figure IV.11: Courbe d'étalonnage $A = f(C)$ de la curcumine dans l'éthanol à 425 nm.

La quantité de curcumine encapsulée et le pourcentage d'encapsulation dans les films d'hydrogels ont été calculés par les équations (IV.5 et IV.6), respectivement.

La quantité ou bien la masse encapsulée de la curcumine a été calculée par la formule :

$$(\text{Masse encapsulée}) (\text{mcf}) = (m_i - m_s) \quad (\text{éq IV.5})$$

La différence entre la concentration initiale et la concentration au temps t du médicament dans la solution permet de calculer la quantité de médicament inclus dans l'hydrogel. (éq IV.5)

Pour vérifier le procédé après le séchage des films d'hydrogels, la curcumine de certains films de masse connus a été extraite dans l'éthanol et sur la base de la courbe d'étalonnage, la quantité de curcumine immobilisée dans les films d'hydrogels a été déterminée.

Dans ce cas, l'efficacité d'immobilisation a été calculée en utilisant la formule suivante IV.6 [267]:

$$\text{Taux d'encapsulation } E_i (\%) = (mcf / m_i) * 100 \quad (\text{éq IV.6})$$

Avec $E_i (\%)$: Efficacité en immobilisation.

m_i : La quantité de curcumine initiale (la masse totale).

m_s : La quantité de curcumine dans le surnageant (la masse filtrée).

mcf : La quantité de curcumine encapsulée dans les films.

Trois mesures ont été effectuées pour chaque échantillon et les erreurs étaient de 0,3 %.

IV.6.10. Etude de la cinétique de libération de la curcumine dans les films hydrogels à base de CS/CMCOx

❖ Etude de la perméabilité transdermique *in vitro* par cellules de diffusion verticale de Franz

La cinétique de libération de la curcumine *in vitro* à partir des films d'hydrogels obtenus (CS/CMCOx) a été étudiée dans deux milieux de pH différents: ABS de 0,1 M à pH = 5,5 (similaire au pH de la peau) et PBS de 0,1 M à pH = 7,4 (similaire au pH du sang) avec 1% de Tween 80, à la température de 37 °C, jusqu'à l'équilibre. Afin d'étudier la perméabilité transdermique *in vitro*, la libération de curcumine a été étudiée à l'aide d'une cellule de diffusion Franz (2 cm de diamètre, 15 ml de volume récepteur) de type (Perme Gear, Hellertown, USA) qui a été exploitée. Cette cellule (figure IV.12) est constituée de deux compartiments cellulaires étant séparés (donneur et récepteur) entre lesquels une membrane de dialyse (Sigma®, USA, 12 000 Da) choisie comme membrane modèle ainsi que la peau de poulet a été placée. La peau a été dégraissée avec l'alcool éthylique à 96% en utilisant des pansements stériles, et ensuite également conservée dans une solution de glycérine à 10% pendant 24 heures avant d'être utilisée. La membrane ainsi préparée a été fixée entre le donneur et le compartiment récepteur. Les films chargés de la curcumine immobilisée (de taille 2,5 x 2,5) ont été placés dans le compartiment donneur de la cellule de Franz sur la surface de la membrane de peau de 12,56 cm². 1 ml de solution de pH = 5,5 ou pH = 7,4 a été placé dans le récipient du donneur.

La cinétique de libération de la curcumine a eu lieu sous agitation magnétique (150 tr / min) à l'abri de la lumière et la cellule de Franz a été recouverte dans du papier d'aluminium ; la température dans le compartiment récepteur a été maintenue constante à 37 °C. Pour chaque analyse, 0,5 ml de l'échantillon ont été prélevés puis reconstitués avec une solution fraîche (pH = 5.5 ou pH = 7.4) dans le compartiment récepteur à des intervalles de temps prédéterminés pour une mesure quantitative de la curcumine libérée. Ensuite, la concentration de la curcumine libérée a été mesurée à partir de la courbe d'étalonnage en mesurant l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre UV-vis nanogoutte à 425 nm.

Les courbes d'étalonnage de la curcumine sont illustrées sur la figure IV.13 et ont trouvé les équations suivantes: $y = 0,0079x$ (à pH = 7,4) respectivement $y = 0,0104x$ (à pH = 5,5). Toutes les déterminations ont été effectuées en triple. L'écart type était de $\pm 5\%$.



Figure IV.12 : Etude de cinétique de la perméabilité transdermique in vitro par cellule de diffusion verticale de Franz.

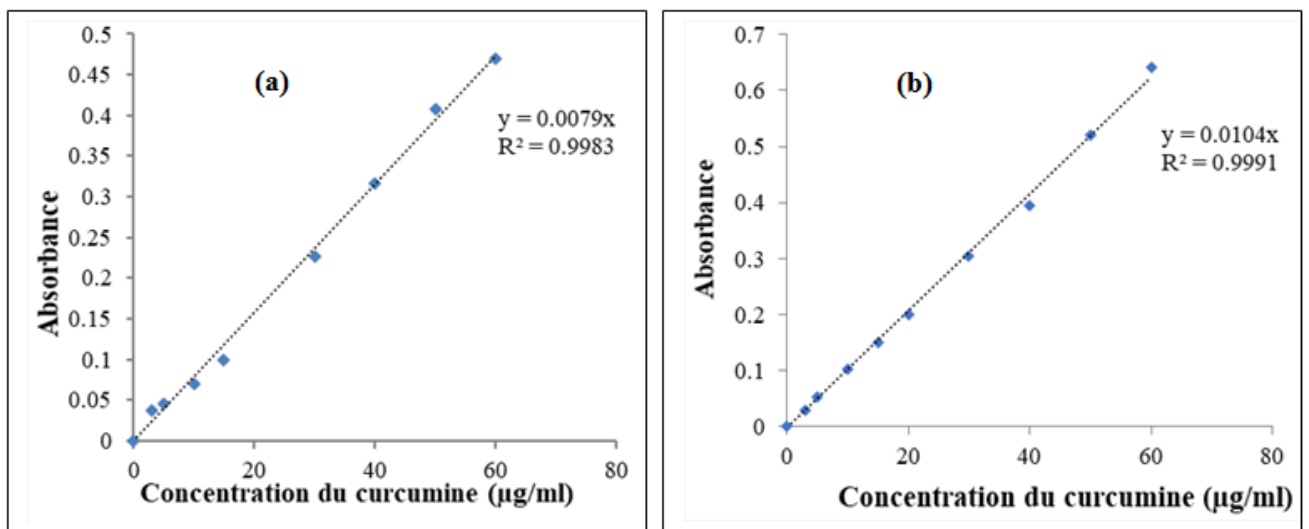


Figure IV.13: Courbes d'étalonnage du curcumine dans la solution PBS de pH=7.4 (a), et solution ABS de pH=5.5 (b).

La perméabilité de la curcumine (P) des films analysés a également été calculée à travers la membrane de peau et exprimée en (μg de curcumine / cm^2) par la relation IV.7, et l'efficacité de libération (%) a été calculée par la relation IV.8:

$$P = \frac{M_r + M_s}{s} \quad (\text{éq IV.7})$$

$$E_f \% = \frac{M_r + M_s}{M_i} \times 100 \quad (\text{éq IV.8})$$

Où M_r : représente la quantité de curcumine libérée dans le récepteur;

M_s : représente la quantité de curcumine trouvée dans la membrane de peau;

S : représente la surface du film (12,56 cm²);

Mi : représente la quantité totale de curcumine immobilisée dans le disque de film utilisé pour la libération.

IV.6.11. Etude de la cinétique de libération de la curcumine dans les films hydrogels à base de CS/LA/CMCOx

La cinétique de libération du médicament a été étudiée dans deux milieux différents ; (solution saline tamponnée au phosphate (PBS), pH = 7,4) et une solution ABS (solution tampon acétate (ABS), pH = 5,5). Les films hydrogels obtenus à base de (CS/LA/CMCOx) chargés par le complexe d'inclusion (β -CD /curcumine) ont été coupés en petits morceaux à des masses bien déterminées et ont ensuite été placés et immergés dans 20 mL de la solution tampon. L'opération se fait sous une faible agitation et à une température de 37°C , en fonction du temps. De temps en temps, un échantillon de solution de 0,02 ml a été prélevé, dilué à 0,5 ml avec la solution tampon et la concentration de curcumine rechargée et libérée a été mesurée à partir de la courbe d'étalonnage UV de la curcumine effectué par mesure des absorbances des étalons à différentes concentrations. La quantité de curcumine libérée est déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 425 nm en utilisant un spectrophotomètre UV BOECO. La curcumine n'est pas trop soluble dans les milieux aqueux, donc on a ajouté 1% (en poids) de Tween 80 (tensioactif) dans les solutions tampons.

Afin de déterminer la quantité de curcumine libérée, nous avons tracé les courbes d'étalonnage dans les deux solutions tampons (figure IV.14). On a préparé la solution mère par la solubilisation de 10 mg du complexe curcumine dans un volume de 20 mL de milieu aqueux contenant du Tween 80 (surfactant) et une dilution à 1% de cette solution par sept échantillons ont été préparés dont la concentration varie entre 1 ug / ml et 7 ug / ml. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 425 nm en utilisant un spectrophotomètre UV vis Nanodrop. La concentration de la curcumine libérée est déterminée par extrapolation à partir de la courbe d'étalonnage $A = f(C)$ de la curcumine effectués par mesure des absorbances des étalons à différentes concentrations.

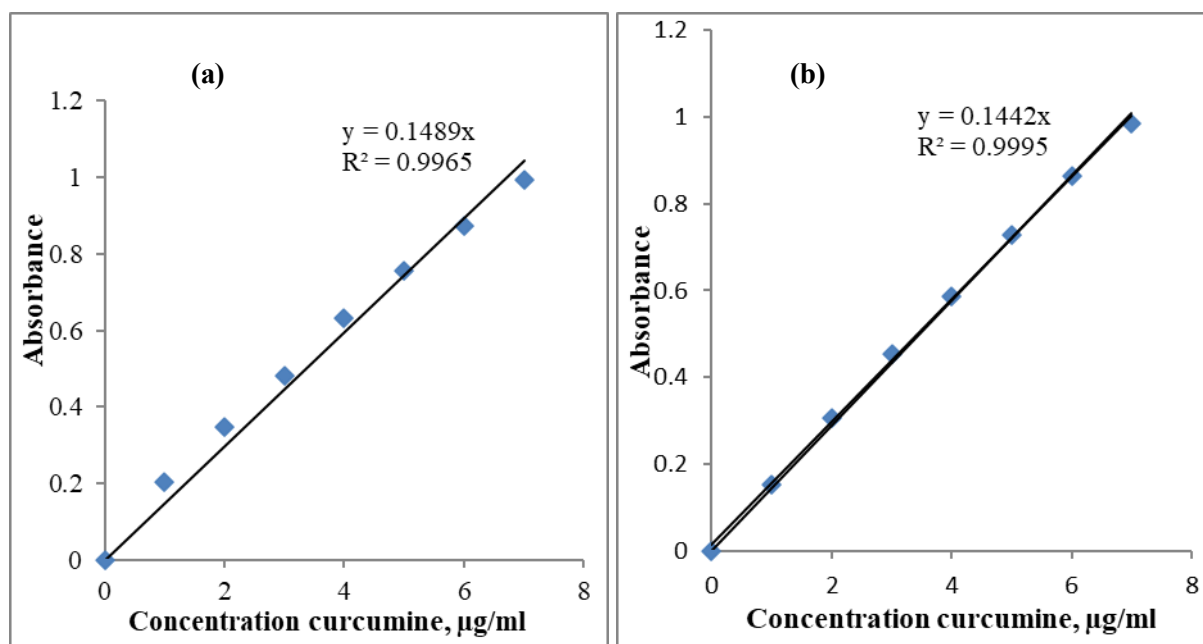


Figure IV.14: Courbes d'étalonnage du curcumine dans une solution tampon phosphate pH 7,4 (a) et dans une solution tampon acétate pH 5,5 (b). Les solutions tampons contiennent 1% de Tween80.

Afin de calculer la quantité cumulée de curcumine libérée par unité de temps, le graphe a été tracé en fonction du temps. La libération de curcumine exprimée en (%) et a été calculée selon l'équation suivante IV.9:

$$\text{Taux de libération (\%)} = (\text{Curcumine libérée} / \text{Curcumine total}) * 100 \quad (\text{éq IV.9})$$

Plusieurs mesures ont été effectuées pour chaque échantillon et les erreurs étaient de 0,3 %.

IV.6.12. Modélisation mathématique des profils de libération

La cinétique de la libération de la substance active à partir de la matrice du film hydrogel à base de polysaccharides est contrôlée par diffusion. Un processus simple de libération est considéré en supposant qu'il y a seulement un transfert du médicament vers la solution aqueuse.

Les modèles mathématiques utilisés pour décrire la libération des principes actifs (curcumine) ne sont pas toujours précis et sont des approximations de la libération réelle, car les paramètres changent durant la libération ; par exemple, le gonflement de la matrice hydrogel cause un changement dans la porosité et la tortuosité, tout comme la distance de diffusion du curcumine change avec le gonflement et l'érosion de la matrice.

Les phénomènes de diffusion sont caractérisés par des modèles mathématiques les plus utilisés par les pharmaciens. Pour décrire la libération des principes actifs des systèmes

matriciels, on utilise le modèle de Korsmeyer-Peppas [268] qui donne une relation simple pour décrire la libération du médicament à partir du système polymère. Ce modèle permet d'attribuer aux cinétiques de libération le type de diffusion sur la base de la valeur de l'exposant n selon l'équation suivante IV.10:

$$M_t/M_\infty = k_v t^n \quad (\text{éq IV.10})$$

M_t/M_∞ : est la fraction du principe actif libéré au temps t .

t : est le temps de libération.

k_v : constante de vitesse de libération.

n : est l'exposant indiquant le mécanisme de la libération.

Dans ce modèle, la valeur de n caractérise le mécanisme de libération du médicament.

Les valeurs donnant le type de mécanisme sont citées :

$n \leq 0,45$ correspond à un mécanisme de diffusion Fickien,

$0,45 < n < 0,89$ transport matière non Fickien,

$n = 0,89$ Cas II (Relaxation) de transport,

$n > 0,89$ Super-Cas II de transport.

L'équation de Korsmeyer peut être utilisée pour analyser la première partie de la courbe de libération (60% au maximum du médicament libéré) où celle-ci est linéairement reliée à t^n , sans pour cela considérer la forme géométrique du système.

IV.6.13. Etude de stabilité de la curcumine immobilisée dans les films à la lumière

La détermination de stabilité de la curcumine libre et immobilisée à la lumière aux films hydrogels obtenus a été déterminée par spectrophotométrie. La curcumine libre et les trois films sélectionnés P1(C), P2(C) et P3(C) à base de CS/LA/CMCOx chargés par le complexe d'inclusion (β -CD/Cur), ce sont des échantillons qui ont été initialement pesés, puis placés dans des boîtes de Pétri et exposés à l'air libre et à la lumière pendant 30 jours. A différentes périodes de temps (presque tous les jours), pour chaque échantillon, un petit morceau a été prélevé, pesé et introduit dans un volume spécifique d'éthanol. Pour cela, la curcumine des particules a été extraite dans l'éthanol. A l'aide d'un spectrophotomètre UV, l'absorbance a été mesurée et sur la base de la courbe d'étalonnage, la quantité de curcumine a été déterminée dans les échantillons analysés. Toutes les valeurs mesurées de l'absorbance ont été effectuées à une longueur d'onde de 425 nm en trois fois et les erreurs étaient environ $\pm 3\%$. Enfin, on a remarqué que la dégradation de la curcumine a pour effet de décolorer et pour chaque mesure la valeur de l'absorbance diminue lorsque la curcumine est dégradée dans la même longueur d'onde.

IV.6.14. Etude de stabilité de la curcumine immobilisée dans les films au pH

Afin d'étudier la stabilité au pH de la curcumine libre et immobilisée dans les films hydrogels sélectionnés de CS/LA/CMCO_x, une solution mère a été préparée initialement par la solubilisation de 10 mg de complexe (β -CD/Cur) dans 100 ml d'alcool éthylique. A partir de cette solution mère, 1 ml a été prélevé et versé dans une fiole jaugée de 25 ml, puis dilué et complété jusqu'au repère (le trait de jauge) avec des différentes solutions de pH: 2,16 ; 3 ; 5,5 ; 6,8 ; 7.4 et 9. La concentration de curcumine dans la solution mère était de 4 μ g / ml et la quantité totale de curcumine dans les films hydrogels était de 100 μ g. Le protocole expérimental a été réalisé selon la méthode décrite précédemment par Suresh D. Kumavat et al, 2013 [269]. Les trois films hydrogels obtenus P1(C), P2(C) et P3(C), respectivement, ont été coupés en petits fragments et pesés à des masses bien déterminées et ont ensuite été placés et immergés dans 10 mL de la solution tampon ayant différentes valeurs de pH sous une faible agitation, puis laissés dans une étuve à une température de 37 °C. Les échantillons ont été protégés complètement afin d'éviter l'interaction avec l'air et la lumière. De temps en temps 0,02 ml de la solution d'échantillon a été prélevé et dilué à 0,5 ml avec la solution tampon et la concentration de la curcumine rechargée a été libérée. La curcumine a été extraite dans l'éthanol. A l'aide d'un spectrophotomètre UV à une longueur d'onde de 425 nm, l'absorbance a été mesurée en trois fois et les erreurs étaient environ \pm 3%, et à partir de la courbe d'étalonnage, la quantité de curcumine a été déterminée dans les échantillons analysés. Sur la base des résultats obtenus, le temps de demi-vie $t_{1/2}$ et la constante k , ont été calculés.

La demi-vie est le temps mis par un médicament pour réduire la moitié de son activité pharmacologique ou physiologique (concentration). Le concept de demi-vie exprimé en (secondes, minutes, heures, ect....) joue un rôle essentiel dans l'administration de la cible, en particulier dans la phase d'élimination, lorsqu'il est utilisé pour déterminer la vitesse de libération/consommation de la substance. Le médicament est réduit à la cible thérapeutique après avoir été absorbé. La demi-vie varie en fonction du type de réaction et de sa cinétique. Pour une réaction de premier ordre, la cinétique peut être décrite par la relation suivante IV.11 :

$$\text{Ln } [A]_t = \text{Ln } [A]_0 - k.t \quad (\text{éq IV.11})$$

La représentation graphique du logarithme de la concentration ($\text{Ln } [A]_t$) en fonction du temps est une droite de pente négative ($-k$) et d'ordonnée à l'origine $\text{Ln } [A]_0$.

La constante de vitesse : $k = (\ln [A]_0 - \ln [A]_t) / t$

La concentration est alors : $[A] = [A]_0 / 2$, il résulte que : $t_{1/2} = \ln 2 / k = 0.693 / k$.

Pour les réactions du premier ordre $t_{1/2}$ ne dépend que de la constante de vitesse k et non de la concentration initiale de la substance. Dans le cas étudié de notre recherche, on constate que la dégradation de la curcumine est régie par une cinétique d'ordre I.

IV.6.15. Etude de l'activité antioxydante de la curcumine libre et immobilisée dans les films de CS/CMCOx

IV.6.15.1. Activité anti-radicalaire par la méthode du DPPH

Pour évaluer l'effet antioxydant de curcumine des hydrogels, nous avons procédé au test de piégeage par le radical libre DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl). Dans cette étude, la méthode par le DPPH est choisie pour évaluer l'activité antioxydante car elle est reconnue comme étant une technique simple, rapide et efficace en raison de la grande stabilité du radical DPPH [270]. La présence de ce radical DPPH• donne lieu à une coloration violette foncée de la solution. Par des dilutions en cascade de composés curcumine à tester, ainsi que la substance de référence (acide ascorbique), nous obtenons une gamme variée de concentrations. Pour chacune d'elles nous mesurons les densités optiques à 515 nm et les valeurs obtenues permettent de tracer des courbes à partir desquelles nous pouvons déterminer le % de DPPH restant et la valeur de l'IC₅₀.

L'activité antioxydante est déterminée par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH à 517 nm (l'activité antioxydante a été évaluée dans l'éthanol), en fonction des concentrations de l'antioxydant ajouté. Cette diminution est due à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H, par les antioxydants (AH) donneurs d'hydrogènes présents dans la molécule ou par une autre espèce radicalaire comme le montre l'équation suivante :



Le protocole expérimental de notre travail a été suivi selon la méthode décrite par Choi et al. [271] avec quelques modifications. La solution mère de curcumine a été préparée en dissolvant 5 mg de curcumine dans 50 ml d'éthanol. Plusieurs dilutions ont été effectuées pour tester l'activité antioxydante, et les concentrations finales des solutions de curcumine étaient comprises entre 10 et 50 µg / ml. 2 ml de chaque concentration de solution a été ajouté dans les tubes à essai, puis sur lequel 2 ml de solution de DPPH 0,1 mM (dans

l'éthanol) a été ajouté. Les échantillons préparés sont vigoureusement mélangés avec un vortex pendant 20 à 30 secondes et mis à l'abri de la lumière à l'obscurité pendant 1 heure à une température de 37 °C. L'absorbance des échantillons a été mesurée après 60 minutes d'incubation en utilisant un spectrophotomètre UV à une longueur d'onde de 517 nm. L'acide ascorbique a été utilisé comme référence.

Les valeurs d'absorbances ont été converties en pourcentage d'activité antioxydante (pourcentage d'inhibition des radicaux libres en DPPH-I%) selon l'équation suivante (IV.12):

$$I\% = 100 - [(A_s - A_b) \times 100 / A_c] \quad (\text{éq IV.12})$$

Avec :

IC₅₀ ou la concentration inhibitrice de 50 %, a été calculée à partir de la représentation graphique I% de la concentration et représentait la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres dans DPPH. Les pourcentages d'inhibitions dépendent des différentes concentrations des échantillons. L'éthanol a été utilisé pour étalonner le spectrophotomètre.

A_s : représente également la valeur d'absorbance pour des solutions de différentes concentrations. En tant que la solution témoin (A_b), une solution utilisée a été préparée à partir de 2 ml d'éthanol et de 2 ml de solutions de curcumine de différentes concentrations (l'absorption sous vide a été mesurée pour chaque concentration).

La solution témoin a été préparée en utilisant 2 ml de solution de DPPH et 2 ml d'éthanol. Les films P1C, P3C et P5C ont été sélectionnés pour déterminer l'activité antioxydante de la curcumine immobilisée. Différentes quantités de ces films contenant entre 10 et 50 µg de curcumine ont été utilisées, et le pourcentage d'inhibition des radicaux libres (IC%) a été déterminé comme décrit ci-dessus. Il a été également déterminé l'activité antioxydante pour la solution de CS, les films d'hydrogel sans curcumine et la curcumine mélangée avec CMCOx dissous dans un mélange éthanol /eau. Il a été préparé des mélanges de curcumine avec la CMCOx en ajoutant les mêmes quantités de curcumine et CMCO que dans les films P1C, P3C et P5C, et les échantillons ont été mentionnés avec M1, M3 et M5. L'activité antioxydante des échantillons M1, M3 et M5 a également été déterminée. Toutes les déterminations ont été effectuées en triple. L'écart type était de ± 5%.

IV.7. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit les modes opératoires et les conditions expérimentales utilisées pour la préparation de différents hydrogels sous forme de films à base de chitosane et lactalbumine réticulés avec la carboxyméthylcellulose oxydée sont présentées, ensuite, les différentes analyses et principales techniques de caractérisation de films hydrogels préparés à base de (CS/CMCOx) et (CS/LA/CMCOx) chargés de la curcumine. Enfin, nous avons détaillé la méthode d'inclusion et l'étude de la cinétique de libération contrôlée du curcumine ainsi la perméabilité transdermique qui est utilisée dans notre étude.

Chapitre V

V.1. Introduction

Pour être utilisés dans des applications biomédicales, les hydrogels doivent être biocompatibles ; c'est la raison pour laquelle ils sont obtenus à partir de biopolymères tels que (chitosane) soit modifiés chimiquement (carboxyméthylcellulose), sans utiliser des réticulants *a priori* toxiques. L'obtention de CMCOx se base sur la modification chimique de CMC par oxydation sous l'action du périodate, pour favoriser la formation des groupements de type aldéhydes (-CH = O). L'agent réticulant de CMCOx est utilisé pour réaliser les réseaux chimiques covalents manifestant un caractère non toxique. Différents hydrogels ont été obtenus par la variation du rapport molaire entre les groupements amines (-NH₂) du chitosane et groupements d'aldéhydes (-CH = O) de CMCOx, qui réagissent en formant des ponts covalents de type base Schiff (-C=N-).[25]

Les hydrogels constituent les supports polymères les plus utilisés pour obtenir des systèmes polymère-principe actif à l'inclusion et libération contrôlée/soutenue de ce dernier. Travaillant en contact ou à l'intérieur de l'organisme, leurs principales qualités doivent constituer en la biocompatibilité, l'absence de toxicité et la biodégradabilité. Nous avons élaboré des hydrogels par réticulation covalente du chitosane, par l'intermédiaire des groupements amine, avec la CMCOx par l'intermédiaire du groupement de type aldéhyde, en évitant donc l'utilisation des agents de réticulation classiques, souvent toxiques.

Dans l'obtention des hydrogels, la température de la réaction, le rapport molaire entre le chitosane et la CMCOx ainsi que le temps de réticulation ont représenté les paramètres dont l'influence a été étudiée. [25] Tous les films hydrogels ont été caractérisés afin de choisir ceux qui présentent les meilleures performances. Les différentes méthodes de caractérisation classique, permettent de définir parmi les films hydrogels analysés, ceux qui présentent la meilleure capacité de rétention de l'eau et la meilleure porosité. La caractérisation structurale, les propriétés thermiques, les caractéristiques mécaniques ainsi que l'étude de la morphologie sont détaillées dans ce chapitre. Cette partie a pour objectif principal de choisir parmi les films hydrogels obtenus celui qui présente les meilleures caractéristiques physico-chimiques afin de la tester par la ninhydrine pour confirmer la réticulation covalente entre les groupements aldéhydes et amines des deux polymères. Le principe de la réticulation de manière covalente des films hydrogels avec le chitosane et la CMCOx a été présenté en utilisant la méthode décrite dans la section V.3.1.

V.2. Obtention de la carboxyméthylcellulose oxydée (CMCOx)

L'oxydation de la carboxyméthylcellulose (CMC) est une méthode de sa modification, qui permet d'améliorer la fonctionnalité de ce composé en augmentant sa réactivité. Le principe de la technique d'oxydation est la conversion du CMC en ses dérivés de dialdéhyde (DCMC) par le périodate de sodium.

Le mécanisme de la réaction d'oxydation de la carboxyméthylcellulose par le périodate de sodium est très complexe. Le périodate de sodium a été utilisé pour oxyder les groupes hydroxyles voisins dans le cycle glucosidique de CMC, mais le clivage des liaisons glycosidiques est également inévitable, conduisant à la dégradation du polymère. Il a été démontré d'après les différentes études sur la cellulose que le mécanisme de la réaction est radicalaire. La carboxyméthylcellulose oxydée est un produit obtenu par clivage sélectif de la liaison C2-C3 dans une unité anhydroglucose de la chaîne polysaccharidique [120, 272], en utilisant le périodate de sodium (NaIO_4) qui fonctionne comme un oxydant puissant. La quantité de périodate ajoutée favorise la teneur en aldéhyde résultante. Afin de vérifier la cinétique d'oxydation du CMCOx pendant le temps, on a caractérisé la CMC et la CMCOx par la spectroscopie infra rouge (FTIR).

La réaction d'oxydation n'a pas formé de composés toxiques [273], et elle s'est déroulée dans l'eau bidistillée à l'abri de la lumière pour éviter l'oxydation avancée. Elle se fait dans un milieu de pH = 6,5 et à une température de 30 °C. Les conditions de cette réaction permettent d'éviter la formation d'aldols catalysés par des milieux alcalins ou des acétals catalysés par des milieux fortement acides.

V.2.1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR): (CMC et CMCOx)

Les spectres FTIR ont été enregistrés pour mettre en évidence la modification chimique du CMC par oxydation, surtout l'apparition des groupes aldéhydes. Environ 1 mg d'échantillon sec a été pressé dans une pastille avec 200 mg de bromure de potassium et les études de spectroscopie FTIR pour les échantillons ont été effectuées sur le spectrophotomètre Bruker Vertex FT-IR. Les spectres FTIR des échantillons ont été enregistrés en mode de transmittance. La figure V.1 illustre les spectres FTIR de la CMC et de la CMCOx par le périodate de sodium pendant 6 heures de réaction.

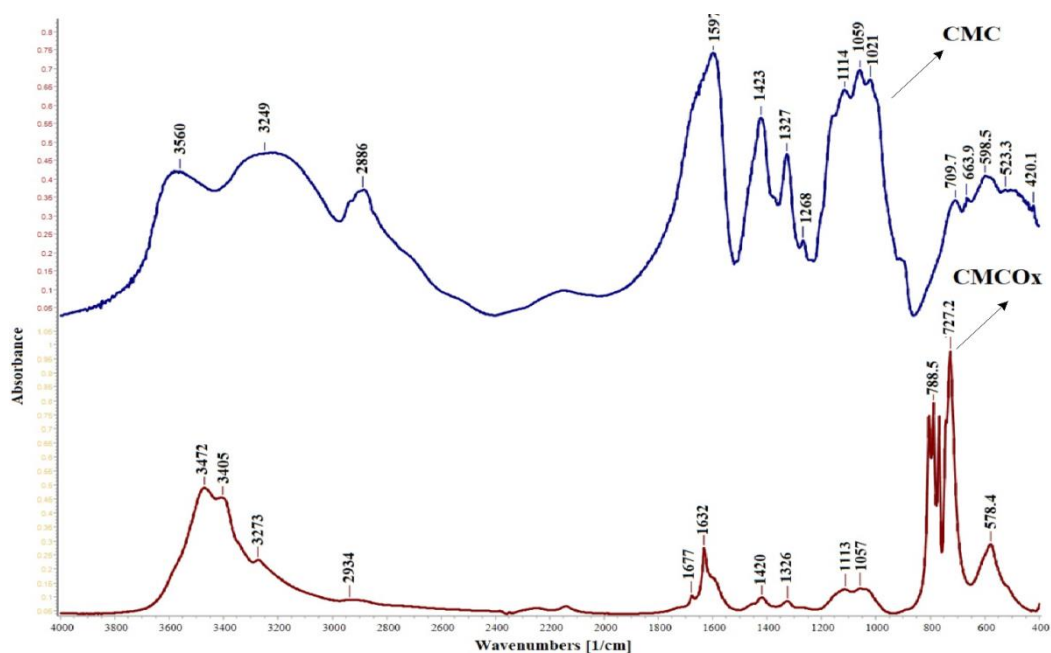


Figure V.1: Spectres FT-IR de la CMC et de la CMCOx (le temps utilisé pour la réaction d'oxydation était 6 heures).

Nous avons constaté selon la figure V.1 que le pic de bande d'absorption à 1599 cm^{-1} dans le spectre CMC semble décalé dans les spectres CMCOx qui apparaissent les pics à 1631 cm^{-1} et 1632 cm^{-1} . L'absorption à 1599 cm^{-1} peut être attribuée à la bande extensible asymétrique du groupe carboxyle de l'acide glucuronique dans le spectre CMC [274], et l'apparence des bandes d'absorption à une fréquence inférieure à partir de 1631 cm^{-1} est caractéristique pour C = O conjugué à partir d'un anion carboxylate et pourrait être déterminée par la dégradation et l'absorption d'eau par CMCOx [275].

L'apparition d'un nouveau pic d'absorption d'une faible intensité à partir de 1677 cm^{-1} qui est caractéristique des groupes cétones insaturés, c'est une indication claire de l'oxydation partielle de la CMC s'est produite [276, 277]. Le pic d'absorption de $1725\text{ à }1740\text{ cm}^{-1}$, devient spécifique au groupe aldéhyde [276], ne s'est pas produit car il est possible que des groupes aldéhydes ont été trouvés dans les formes hydratées du CMCOx et que les hémiacétals peuvent être masqué et apparaître déplacés à 1677 cm^{-1} . Par exemple, dans le cas de l'oxydation du dextrane et de l'inuline, les auteurs n'ont pas pu identifier dans les spectres FTIR la bande d'absorption spécifique du groupe aldéhyde [278, 279]. Des bandes d'absorption d'environ 800 cm^{-1} peuvent être attribuées à des semi-acétals se formant entre les groupes aldéhydes et les groupes hydroxyles vicinaux [280, 281].

Aussi, la bande d'absorption à 3593 cm^{-1} correspondant à la vibration d'élongation du groupe OH dans le spectre CMC devient plus étroite dans les spectres CMCOx.

La bande d'absorption se déplace vers 3472 cm^{-1} , ce qui probablement indique que le nombre des groupes hydroxyles se réduit au détriment des carbonyles aldéhydiques après la réaction d'oxydation. Cette dernière remarque ne peut être prise en compte puisque les carbonyles de façon générale sont aptes à former des liaisons hydrogènes et la vibration d'élongation des OH ne peut être quantifiée. Les bandes d'absorption de 1424 cm^{-1} à 1328 cm^{-1} attribuées aux groupes carboxyle dans le spectre CMC sont maintenues, mais apparaissent légèrement déplacées, ce qui indique des changements structurels suite à la réaction d'oxydation.

L'oxydation de la CMC par le periodate passe progressivement de la phase amorphe à la phase cristalline, elle provoque les modifications des propriétés physiques et chimiques de la carboxyméthylcellulose. L'augmentation du temps de la réaction dégrade davantage l'échantillon. Dans cette étude, l'oxydation de la CMC a été effectuée en triple. En conclusion, à base de l'analyse FTIR on peut affirmer que la carboxyméthylcellulose peut être oxydée par le périodate en formant le dérivé dialdéhydique.

V.2.2. Caractérisation par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) permet d'observer les environnements chimiques des isotopes ayant un spin nucléaire non nul et de déterminer ainsi la structure des composés.

La ^1H RMN et ^{13}C RMN sur des polysaccharides donne en général des spectres inexploitable à cause du grand nombre d'atomes d'hydrogène ou de carbone dans de multiples environnements. Les spectroscopies ^1H -RMN et ^{13}C -RMN, a également permis d'obtenir des informations sur les groupes fonctionnels des CMC et CMCO. Les spectres ont été représentés sur les figures V.2 et V.3).

si les signaux correspondant aux groupements aldéhyde étaient trouvés dans les spectres de CMCOx. La figure V.2 montre que les spectres ^1H RMN de l'échantillon CMCOx (le temps de la réaction d'oxydation pour cet échantillon était de 6 heures) qui dissous dans l'eau deutérée ou du DMSO présentent des pics caractéristiques similaires à ceux des spectres de CMC. La formation de groupements aldéhydes dans l'unité structurale de CMC est mise en évidence dans le spectre ^1H RMN du CMCOx dissous dans l'eau par la présence du signal singulet à 9,24 ppm et pour le spectre du CMCOx dissous dans le DMSO à 10,11 ppm, 9,92 ppm ou 9,58 ppm, ces pics sont caractéristiques du proton des groupes aldéhydes. Plusieurs signaux dans la région de 3,14 jusqu'à 4,7 ppm pourraient être attribués aux groupements ($-\text{CH}-$ ou $-\text{OH}$).

La spectroscopie ^{13}C RMN (la figure V.3) montre que dans le spectre du CMCOx dissous dans l'eau deutérée, il n'y a pas de signaux des groupements aldéhydes dans la région qui situé entre 190 ppm et 200 ppm. Pourtant, un signal caractéristique des groupes carbonyle dans les cétones apparaît à 217,77 ppm. Il existe une possibilité que la forme hydratée des groupements aldéhydes puisse apparaître dans une solution aqueuse [282, 283], mais les signaux caractéristiques n'ont pas été trouvés dans le spectre de CMCOx dissous dans l'eau deutérée. Dans le spectre du CMCOx dissous dans le DMSO, il existe des signaux des groupements aldéhydes à 204,03 ppm, 200,29 ppm, 197,78 ppm et 194,06 ppm.

Dans le spectre CMC qui dissous dans l'eau deutérée, le signal à 102,45 ppm correspond à l'atome de carbone C1 dans l'unité anhydroglucose. Le signal de 71,315 ppm est attribué au groupement méthylène pour l'atome C7. Le signal du groupement carboxylique apparaît à 178,146 ppm et peut être attribué à l'anion carboxylé. Le signal de 59,88 ppm peut être attribué pour l'atome C6 de l'unité anhydroglucose de la CMC native, tandis que le signal correspondant de l'atome de carbone C6 dans la CMC a été déplacé à 70,4 ppm [284].

Pour la CMCOx qui dissous dans le DMSO, on observe dans le spectre ^{13}C RMN que les signaux appartenant aux atomes C2 et C3 à partir de 73,28 ppm et 74,96 ppm respectivement du spectre CMC, ne se produisent plus, c'est une confirmation de l'oxydation de la CMC.

Dans le spectre ^{13}C RMN de la CMC qui dissoute dans l'eau, nous observons une légère réduction de l'intensité du signal de ces deux atomes de carbone. La littérature mentionne que lorsque le degré d'oxydation est plus élevé, l'intensité de ces pics est plus faible. L'oxydation de la CMC détermine plusieurs signaux dans la région qui situé entre 80

et 105 ppm. Les signaux obtenus sont attribués aux atomes de carbone des groupements C-O-C des hémiacétals [282]. Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux rapportés par d'autres études [282, 284].

V.2.3. Détermination de la teneur des groupements aldéhydes du CMCO

La teneur en aldéhyde a été déterminée par une voie indirecte, par titrage iodométrique de l'acide périodique résiduel présent dans le mélange réactionnel. 1 ml d'une partie du mélange réactionnel, a été versé dans un erlenmeyer, puis on ajoute 1 ml de KI (20%) et 1 ml de HCl (37%). L' I_2 formé a été titré avec le thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$) 0,05 N jusqu'à ce que le point final marqué par la disparition de I_2 qui a été visualisé par addition d'amidon soluble. Le titrage similaire a été également réalisé avec un échantillon témoin [261]. Toutes les expériences ont été effectuées en triple.

L'oxydation de la CMC par le periodate favorise la formation de groupes dialdéhydes, suite à une scission homolytique de la liaison C2-C3 (figure V.4).

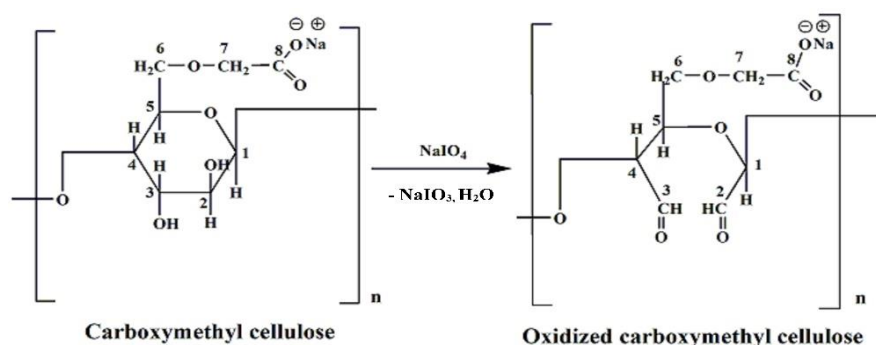


Figure V.4 : Représentation schématique de la réaction d'oxydation de CMC par le periodate de sodium ($NaIO_4$) [120].

V.2.4. Mécanisme d'oxydation de la CMC

Un aperçu sur le mécanisme réactionnel de l'oxydation de la CMC par le periodate de sodium est proposé suite à une recherche bibliographique variée. Il est à noter que l'anion periodate favorise la formation d'aldéhyde suite à une scission de la liaison carbone-carbone porteurs des hydroxydes OH [285].

Le mécanisme généralement proposé fait intervenir la dissociation du periodate puis l'anion IO_4^- forme un intermédiaire cyclique qui conduit aux aldéhydes.



La réaction du motif de la CMC avec l'anion periodate donne lieu à un intermédiaire réactionnel ionique de type ester cyclique (figure V.5). A ce niveau de la réaction, il n'y a pas de réduction de l'espèce periodate mais une perte d'eau et fixation de l'alcool pinacolique.

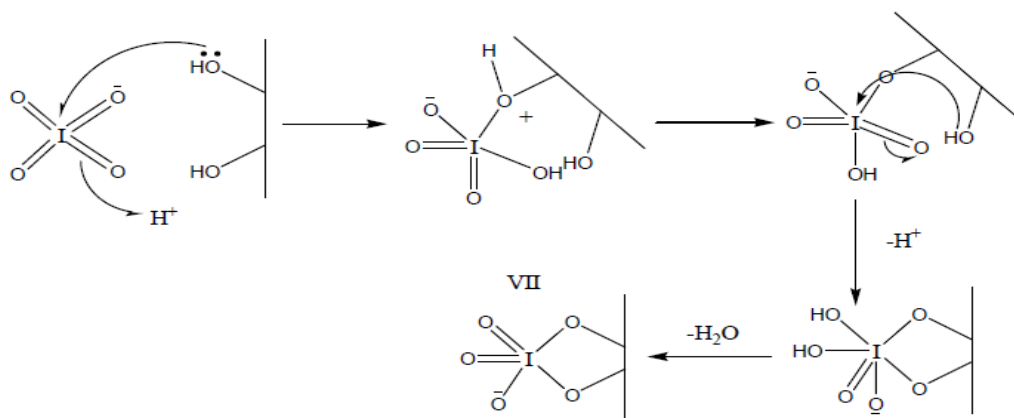


Figure V.5: Première étape du mécanisme d'oxydation de l'alcool pinacolique par le periodate de sodium [286].

L'espèce cyclique à 5 chaînons se décompose immédiatement par réarrangement électronique. Le mécanisme concerté conduit à deux réductions successives de l'halogène, en le faisant passer du degré d'oxydation VII à V, et à l'oxydation des deux carbones porteurs des fonctions alcools. La particularité de ce mécanisme est qu'il induit une coupure de la liaison C₂-C₃ (figures V.5-6).

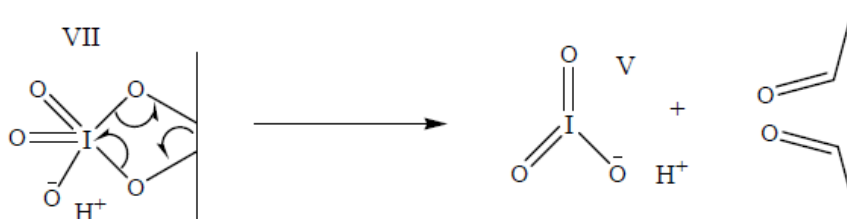


Figure V.6 : Mécanisme concerté de l'intermédiaire réactionnel cyclique à 5 chaînons [286].

L'oxydation des diols vicinaux dans le polysaccharide donne des dérivés dialdéhydes avec ouverture du cycle. Pour confirmer la formation de carbonyle, nous avons constaté simplement par FTIR qu'une bande d'absorption spécifique à ce groupement est apparue dans le spectre du CMCOx.

V.2.5. Cinétique de l'oxydation du CMC

La consommation de thiosulfate de sodium dans l'échantillon est la mesure de l'excès de periodate de sodium. Il est connu qu'une mole de periodate de sodium forme deux groupes aldéhydes. Nous avons donc calculé la quantité de periodate de sodium au cours de

l'oxydation du CMC par périodate. Nous avons effectué notre expérience de 1h à 6h. Au fur et à mesure on observe que lorsque le temps d'oxydation augmente, la quantité du périodate est diminuée. La cinétique d'oxydation de la CMC est représentée par la variation de la consommation de quantité de périodate (NaIO_4) en fonction du temps comme le présente dans la figure V.7.

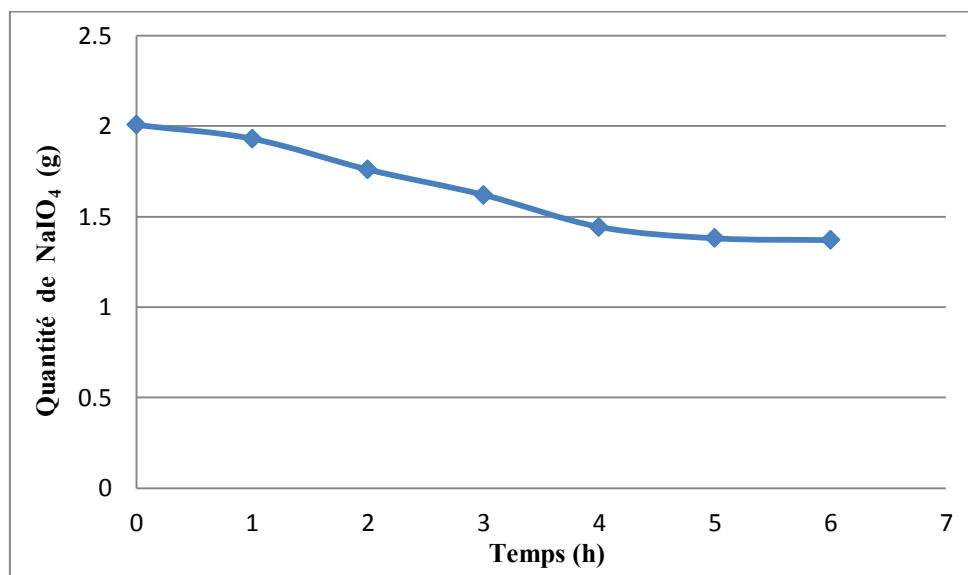


Figure V.7: La variation de la quantité du périodate (NaIO_4) en fonction du temps.

D'après la figure V.7 on remarque que la concentration du périodate est diminuée en fonction du temps pendant toute la durée de l'oxydation, c'est-à-dire les teneurs en aldéhyde augmentent avec le temps de la réaction. Elles vont de 2,006 g et 1,37g respectivement pour des temps de la réaction s'étendant de 1h à 6h. On peut conclure que dans les conditions opératoires étudiées, les teneurs en aldéhyde évoluent avec le temps. De même que précédemment, nous remarquons une diminution de la concentration de NaIO_4 quand les fonctions aldéhydes (CHO) augmentent. Ces résultats sont en accord avec les travaux menés par Chetouani et al. [287] qui ont démontré que la teneur en aldéhyde augmente avec le temps, et le pourcentage en CHO est diminué quand la concentration de KIO_4 augmente.

V.2.6. Influence du temps de la réaction sur le degré d'oxydation

Le degré d'oxydation (pratiquement l'efficacité de la réaction d'oxydation) représente le nombre de liaisons C2-C3 converties en dialdéhydes par rapport au nombre total de liaisons C2-C3. Le degré d'oxydation peut être contrôlé par la quantité ajoutée de périodate, en combinaison avec les conditions de la réaction d'oxydation. Étant donné que la quantité d'aldéhydes affecte les propriétés du matériau, il devient important de pouvoir quantifier que

le niveau d'oxydation souhaité a été atteint. Différentes méthodes ont été utilisées pour étudier le degré d'oxydation. Afin de déterminer le degré d'oxydation, un volume de 100 ml de solution de CMC à une concentration de 3% (m / v) a été préparé, et le protocole expérimental a été décrit dans la section IV.3.3 de matériaux et méthodes.

La figure V.8 montre que le degré d'oxydation augmente en fonction du temps de la réaction d'oxydation. En effet, elle représente un autre moyen d'exprimer la cinétique du procédé d'oxydation. Le degré d'oxydation a été estimé en déterminant la concentration de periodate non consommé par iodométrie après 6 h. A la fin de la réaction d'oxydation, le degré d'oxydation est d'environ de 23%.

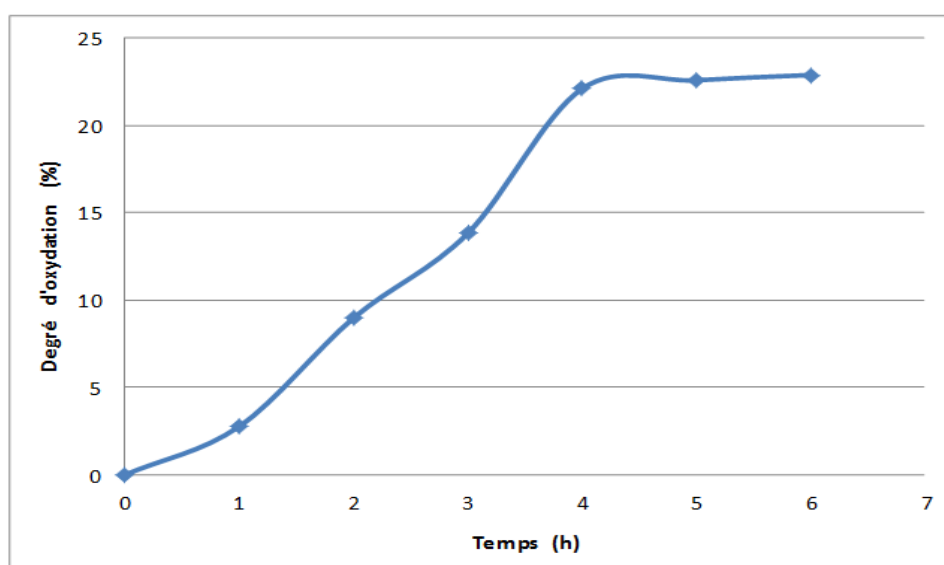


Figure V.8 : Variation dans le temps du degré d'oxydation de la CMC.

L'examen de la figure V.8 montre que le degré d'oxydation augmente progressivement en fonction du temps d'oxydation jusqu'à 4 h lorsqu'il atteint la valeur de 22,11%. La courbe cinétique atteint pratiquement un plateau à partir de 4h et le degré d'oxydation se stabilise jusqu'à la valeur de 22,9% après 6 heures, évidemment en parfaite concordance avec la courbe de consommation de NaIO_4 présentée dans la fig.V.7. Par conséquent, l'oxydation partielle a été obtenue, car une oxydation avancée peut entraîner l'oxydation des groupes carbonyle en groupes carboxyliques et, éventuellement, la dégradation de la chaîne polysaccharidique avec une réduction drastique du poids moléculaire. Le nombre de moles de groupes aldéhyde est varié, et il était compris entre $0,71 \times 10^{-3}$ et $5,86 \times 10^{-3}$ moles de CHO / g de CMCOx.

Des résultats similaires ont été trouvés et rapportés dans la littérature, où il a été montré que le nombre de groupes aldéhyde augmente avec le temps dans la réaction d'oxydation [288, 289].

Un premier effet de l'oxydation sur la CMC est l'augmentation de sa solubilité dans l'eau avec le degré d'oxydation. Cet effet est déterminé d'une part par la croissance du nombre des groupements carbonyle, qui sont moins impliqués dans des liaisons d'hydrogènes formées entre les chaînes du polymère par comparaison aux groupements -OH, et d'autre part par la décroissance du poids moléculaire de la CMCOx due à la réaction inévitable de dégradation dans le milieu fortement acide (HCl) dans lequel se passe la réaction. Le processus d'oxydation a été terminé à environ 6 heures dans l'obscurité. Dans les recherches antérieures, on estime que le retard du processus d'oxydation peut être provoqué par la liaison hydrogène qui se forme entre le groupe carboxyle d'une chaîne polymère et le groupe hydroxyle de l'atome C3 des chaînes voisines. Donc, le degré d'oxydation peut également être ajusté en modifiant le rapport entre les réactifs [282].

V.2.7. Détermination du poids moléculaire

La réaction d'oxydation peut être également accompagnée par la dégradation du polysaccharide, qui a pour effet la réduction de son poids moléculaire. Il a été nécessaire de contrôler la variation de cette caractéristique pour la CMCOx obtenue après différents temps d'oxydation en utilisant la méthode viscosimétrique. La figure V.9 montre la variation du poids moléculaire de CMC avec le temps de la réaction d'oxydation.

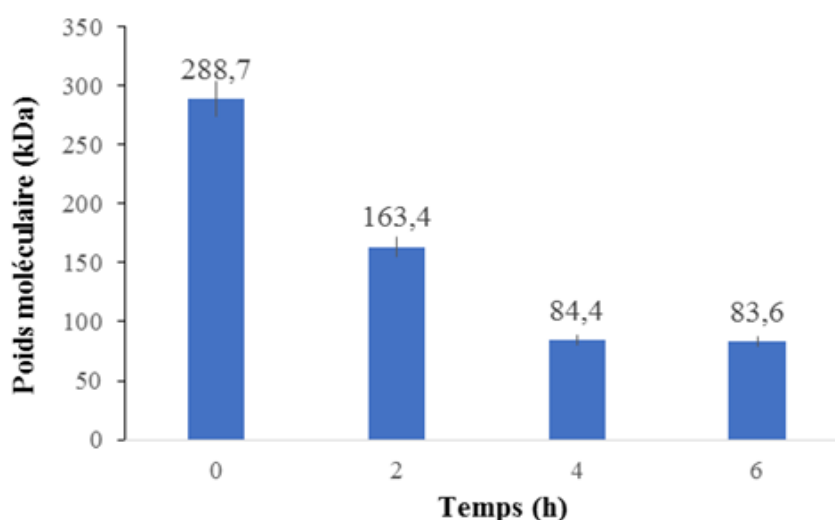


Figure V.9 : Variation du poids moléculaire de la CMC avec la durée du processus d'oxydation.

Les conséquences du processus d'oxydation sur le poids moléculaire de la CMC ont été évaluées. Différents degrés d'oxydation ont été obtenus pour trois échantillons en faisant varier le temps de réaction d'oxydation (entre 2 et 6 heures). Les quantités de réactifs ont été maintenues constantes (1 g de NaIO₄ et 1 g de CMC) dans chaque synthèse. Il y avait une réduction significative du poids moléculaire de la CMC avec l'augmentation du temps d'oxydation en raison de la dégradation du polysaccharide. Les résultats obtenus sont concordants avec les résultats obtenus par Eremeeva et Bykova [290]. Le degré d'oxydation maximal obtenu était de 22,9 % et le poids moléculaire de la CMC initiale avant l'oxydation est 288,7 KDa et pour la CMCOx après 6 heures d'oxydation est environ 83,6 KDa. Nous pouvons constater le fait que la réduction du poids moléculaire du polysaccharide a eu lieu par hydrolyse des liaisons glycosidiques dans les unités structurales au cours du processus d'oxydation, diminuant lorsque le degré d'oxydation augmente. On peut noter que la variation de poids moléculaire de CMCOx était cohérente avec le degré d'oxydation. Après quatre heures d'oxydation de la CMC, la valeur de poids moléculaire était presque constante et le phénomène de dégradation est diminué en intensité, ce qui entraîne une diminution de la quantité de NaIO₄ déterminée par l'avancement de la réaction d'oxydation.

V.3. Obtention des hydrogels sous forme de films à base de chitosane et CMCOx

L'intérêt suscité par les hydrogels est en raison de leurs nombreuses applications. Comme il est bien connu, pour obtenir des hydrogels il faut partir de polymères fortement hydrophiles qui sont soumis à une réaction de réticulation en vue de les transformer dans des structures tridimensionnelles. Pour ce but, il faut utiliser des composés bifonctionnels de faible masse moléculaire, qui réagissent avec les groupements fonctionnels du polymère en formant des ponts entre les chaînes ; mais il faut préciser que ces agents de réticulation sont souvent toxiques, et donc pas trop indiqués pour obtenir des hydrogels avec des applications biomédicales.

Nous avons donc décidé de procéder à la synthèse de nouveaux hydrogels à base de chitosane (CS) et de carboxyméthylcellulose oxydé (CMCOx), ce dernier en jouant d'une part le rôle de partenaire pour le chitosane en formation de la structure réticulée, et d'autre part même d'agent de réticulation, évidemment totalement non toxique.

Dans la synthèse de ces hydrogels, nous avons adopté par conséquent la méthode de la réticulation chimique par la réaction entre les groupes complémentaires, ça veut dire les groupements -NH₂ du chitosane et les groupements -CHO de la CMCOx.

Nous avons préparé une série d'hydrogels en faisant varier le taux du CMCOx par rapport au chitosane comme indiqué dans le tableau V.1. Il faut faire la mention que le rapport entre les deux polymères a été en effet exprimé par le rapport entre le nombre de moles des groupements fonctionnels caractéristiques (-CH=O/-NH₂). Des films d'hydrogels à base de CS avec CMCOx ont été obtenus à pH = 2,4 et à une température de réaction à 55 °C. À une valeur de pH plus élevée, le CS précipite en raison de la réduction de sa solubilité, mais peut-être aussi en raison des groupes carboxyliques de CMCOx qui peuvent interagir électrostatiquement avec les groupes amines du CS formant des complexes polyélectrolytiques. La réaction entre les groupes amines protonés de CS et les groupes aldéhyde de CMCOx, se fait par la formation de groupes imines ou de bases de Schiff. La réaction de réticulation est influencée par quelques paramètres telles : le temps où la température de réticulation et la quantité de CMCOx utilisée (le rapport molaire entre les groupes amines dans le CS et les groupes aldéhydes dans la CMC). [25]

Les facteurs influençant la réaction de réticulation mentionnés ci-dessus ont été étudiés dans cette recherche pour obtenir un hydrogel optimal avec des applications biomédicales potentielles capables d'inclure et de contrôler la libération de divers principes actifs, en particulier les polyphénols. Caner et coll. [69] ont étudié l'effet de plusieurs acides sur les propriétés mécaniques et barrières pour obtenir un hydrogel à base de CS. Il a été démontré que l'acide acétique est le meilleur solvant pour obtenir des films d'hydrogel à base de CS ayant de bonnes propriétés mécaniques et barrières. La curcumine a été incorporée par diffusion et évaporation d'alcool après le séchage des films (voir la section IV.6.9.1). Les résultats de l'efficacité d'encapsulation sont donnés dans la section V.5.1 et le protocole expérimental d'obtention de films d'hydrogel a été présenté dans le tableau V.1.

Tableau V.1: Protocole expérimental utilisé pour obtenir des films hydrogels réticulés de manière covalente à base de CS et CMCOx *

Code des échantillons	Rapport molaire (-CH=O/-NH ₂)	CMCOx (-CH = O) (molesx10 ³)
P1	R (0,25/1)	0.4375
P2	R (0,375/1)	0.656
P3	R (0,5/1)	0.875
P4	R (0,75/1)	1.3125
P5	R (1/1)	1.75
P6	R (1,5/ 1)	2.625
P7	R (2/1)	3.5

- Le nombre de moles de groupements $-NH_2$ dans le CS a été maintenu constant, respectivement $1,75 \times 10^{-3}$ moles. Le volume de la solution de CS était de 20 ml et le volume de la solution de CMCOx était de 10 ml. 0,3 g de glycérine ont été ajoutés dans chaque synthèse pour éviter l'obtention de films fragiles et cassables. Les films chargés de la curcumine et contenant les mêmes rapports molaires ont été codés avec P1C, P2C, P3C, P4C, P5C, P6C et P7C.

Le rendement d'obtention des films dépend du rapport molaire entre les deux polymères.

La figure V.10 montre la variation du rendement (%) avec le rapport molaire. On constate, comme on s'attendait, l'augmentation du rendement avec ce rapport, donc avec l'augmentation de la quantité de CMCOx dans la composition du mélange de départ utilisé pour l'obtention de l'hydrogel.

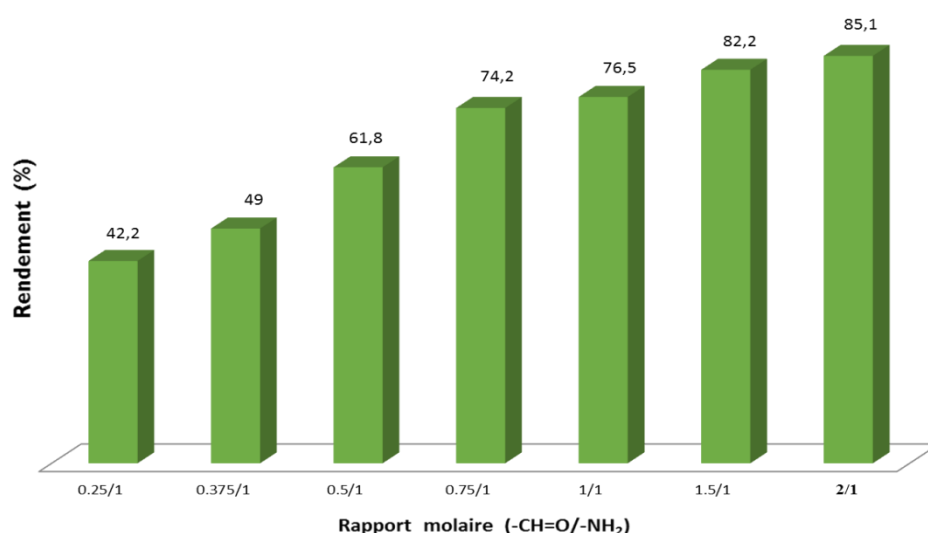


Figure V.10 : Variation du rendement d'obtention des films en fonction du rapport molaire

$-CH=O/-NH_2$ ($t_{\text{reaction}} = 2.5$ h ; $T_{\text{reaction}} = 55^{\circ}C$, $pH = 2,4$).

V.3.1. Structure des hydrogels par la réticulation covalente de CS et de CMCOx

Le CS et la CMCOx ont été mélangés dans divers rapports molaires en tenant compte du fait que la CMCOx participe à la réticulation covalente, par des interactions entre les groupes amines de CS et les groupes aldéhydes de CMCOx. Dans le calcul des groupes fonctionnels on a tenu compte du fait que le CS participe par un groupe amine et la CMCOx participe par deux groupes aldéhydes sur l'unité monomère dans la formation de base schiff.

Les différents paramètres expérimentaux que nous avons fait varier pour élaborer les hydrogels à base de CS et de CMCOx ont été présentés dans le tableau ci-dessus.

A base de la structure de film l'hydrogel P2, prouvée par FTIR (la figure V.18), on peut affirmer que la réaction de réticulation a eu lieu entre les groupements complémentaires de type aldéhyde et amine de deux polymères, ce que l'on peut observer sur la figure V.11 suivante:

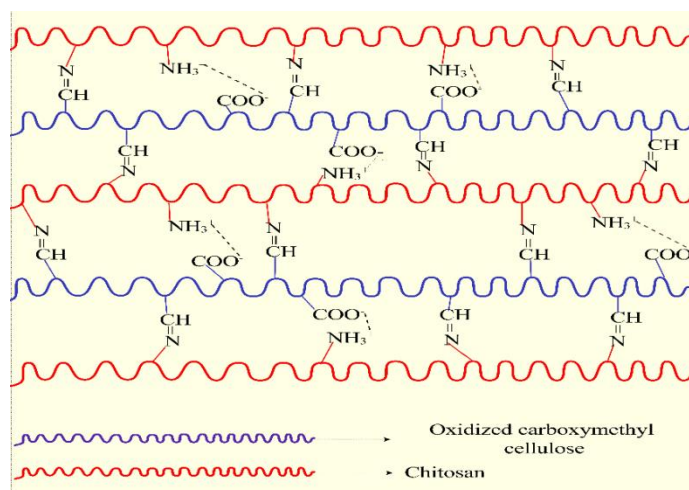


Figure V.11: Présentation schématique de la structure des films d'hydrogel à base de CS/CMCOx.

Les réactions chimiques possibles entre le chitosane et la carboxyméthylcellulose oxydée peuvent être schématisées dans la figure V.12 comme suit :

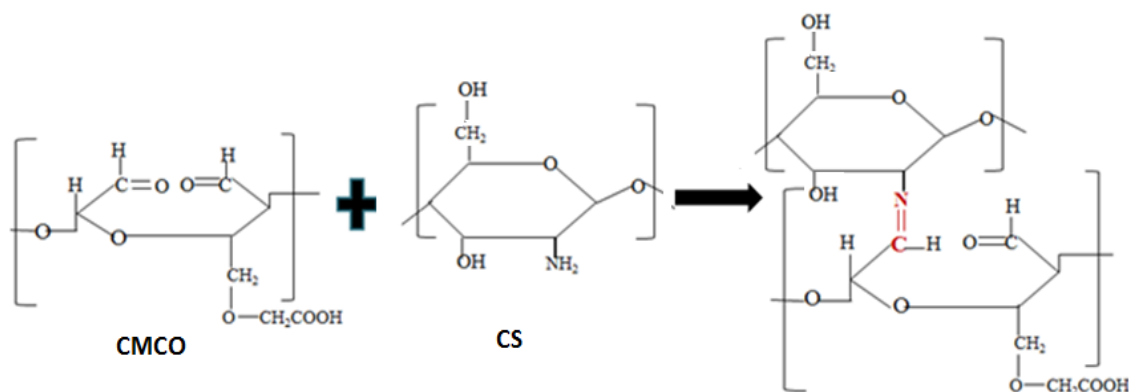


Figure V.12 : Réaction de réticulation covalente du chitosane avec la CMCOx.

Il faut préciser que, à part les ponts de type base schiff entre les deux polymères, des interactions ioniques et des liaisons d'hydrogène peuvent se former entre les chaînes des polysaccharides, qui renforcent finalement le réseau tridimensionnel.

V.3.2. Détermination de la consommation des groupements amines par le test de ninhydrine

La détermination des groupements amines libres à partir de CS et de films d'hydrogel à base de CS réticulés était essentielle car elle fournit des informations sur le degré de conversion des groupes amines de CS en bases Schiff en présence de groupes aldéhydes de CMCOx, nécessaires pour optimiser les paramètres qui peuvent influencer la réaction de réticulation. Le test à la ninhydrine a été utilisé à cet effet (voir la section IV.6.3), et le degré de conversion (DC%) a été analysé pour plusieurs films différents par le rapport molaire initial entre les groupes carbonyles et amines, par rapport aux groupements amines du CS libre. La détection et l'estimation quantitative des acides aminés ont été longtemps accomplies par leur réaction avec la ninhydrine (2,2-dihydroxy-1,3-indandione). Le mécanisme général de la réaction est présenté à la figure V.13.

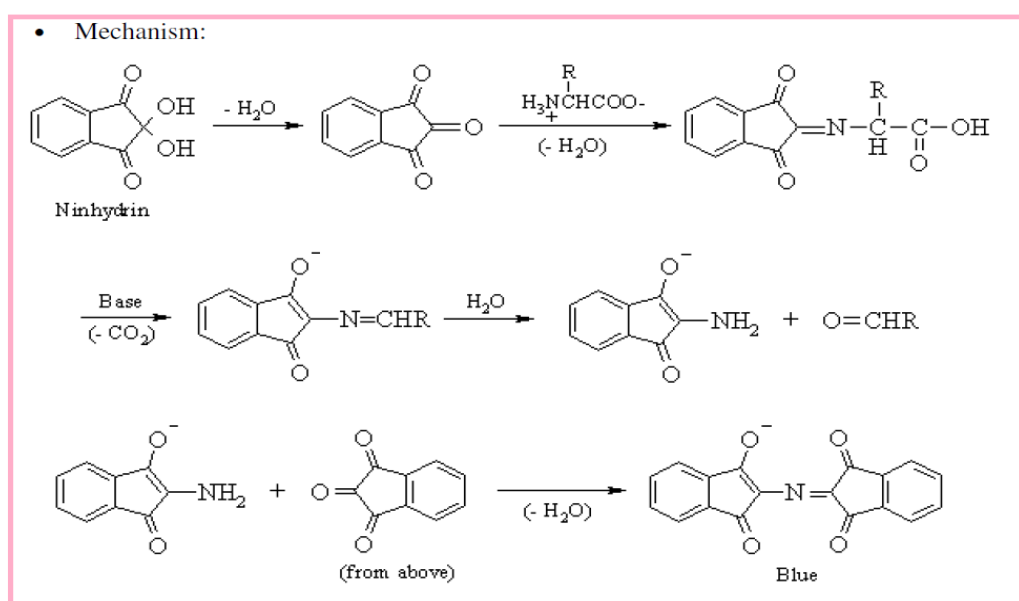


Figure V.13 : Mécanisme de la réaction des groupements amines avec la ninhydrine.

V.3.3. Détermination du nombre de groupements amines réagissant dans les films de CS réticulé avec la CMCOx

Dans le but de déterminer le nombre des liaisons formés par la consommation des groupements amines libres et de vérifier la réticulation des groupements amines du chitosane avec les fonctions aldéhydes du CMCOx, on a utilisé donc le test avec la ninhydrine. Nous avons été intéressés à examiner l'évolution pendant le temps du nombre des groupements

-NH₂ pour un mélange (CMCOx/CS) à un rapport (0.375/1) dans un interval de temps allant de 1h jusqu'au 6h (figure V.14).

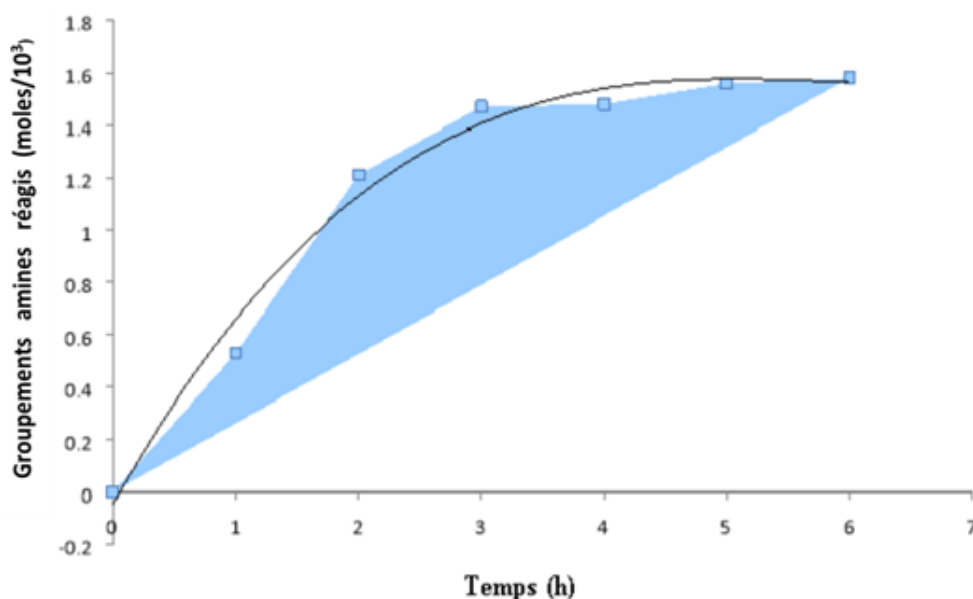


Figure V.14: Evolution pendant le temps du nombre de moles des groupements amines réagissant pour le mélange CMCOx/CS (film P2, R (0.375/1), ($T_{\text{reaction}}= 55^{\circ}\text{C}$)).

La figure V.14 indique que dans toute la période de temps, le nombre de groupements amines du CS réagis avec la CMCOx augmente progressivement jusqu'à une valeur maximale de $1.58 \cdot 10^{-3}$ mole. Ceci peut nous renseigner sur l'augmentation du nombre des liaisons formées (base Schiff) par la consommation des groupements amines et donc sur l'évolution du degré de réticulation des films en fonction du temps pendant 6 heures. On constate, donc, l'augmentation du nombre des groupements amines réagis pendant le temps, donc l'augmentation du taux de réticulation, effet tout à fait normal et donc attendu. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Hoffmann *et al.* (2009) [18].

La quantité de groupements amines qui ne participe pas à la réticulation (déterminée par le test à la ninhydrine) diminue lorsque la quantité de CMCOx augmente, - mais on voit qu'il reste encore des groupements pas réagis même si le nombre des moles de groupements aldéhydes est en excès. En conclusion, la durée du processus de réticulation (jusqu'à 6 heures) détermine l'augmentation du degré de conversion de groupements amines (DC_{amine}), donc le taux de réticulation, ce qui est en parfaite concordance avec l'évolution du degré de gonflement des hydrogels dans des milieux aqueux. On constate la diminution des valeurs du degré de gonflement dans les différents milieux étudiés (pH=5.5 et pH=7.4), comme on pourra voir dans les figures V. 22 (a) et (b).

V.3.4. Paramètres d'influence sur le taux de réticulation des hydrogels à base de CS réticulé avec la CMCOx

Le taux de réticulation est important pour les applications biomédicales des hydrogels, parce qu'il influence la capacité des hydrogels de gonfler dans des milieux aqueux, et d'ici, leur capacité d'inclure des médicaments hydrosolubles. Sa valeur pourrait être influencée par plusieurs paramètres à savoir le rapport molaire (-CHO / NH₂), le temps de réaction de réticulation et la température, et nous nous sommes proposés d'étudier cet aspect.

A base des résultats concernant la consommation de groupements amines (respectivement le nombre des groupements qui n'avait pas réagi), on a pu estimer le taux de réticulation exprimé par la conversion du nombre de groupements amines, DC_{amine} (%), lors de la réticulation covalente de CS avec la CMCOx.

On a utilisé pour ce but le test de la ninhydrine qui nous a permis de calculer finalement le DC_{amine} (%) par l'équation précédente IV.3.

V.3.4.1. Influence du taux de réticulant : le rapport molaire entre les groupements -CH=O/NH₂

Nous avons élaboré plusieurs films à caractère d'hydrogel selon les différents rapports molaires successives en variant le nombre de moles de groupes carbonyles de l'agent réticulant (CMCOx) vis-à-vis le nombre de moles de groupes amines de chitosane (gardée constant, respectivement $1,75 \times 10^{-3}$ moles comme mentionné au tableau V.1 pour tous les échantillons : P1(0,25/1) , P2(0,375/1), P3(0,5/1), P4(0,75/1) , P5(1/1) , P6(1,5/1) et P7(2/1).

On a constaté que les films deviennent de plus en plus opaques par l'augmentation de la quantité de CMCOx. Dans le calcul des groupements fonctionnels on a tenu compte du fait que le CS participe par un groupe amine et la CMCOx avec deux groupes aldéhydes sur l'unité monomère.

Les valeurs du DC_{amine} des groupements amines dans les bases de Schiff ont été déterminés par le dosage avec de la ninhydrine des groupements -NH₂ pas réagis, et sont représentées en fonction du rapport -CH=O/-NH₂ dans la figure V.15.

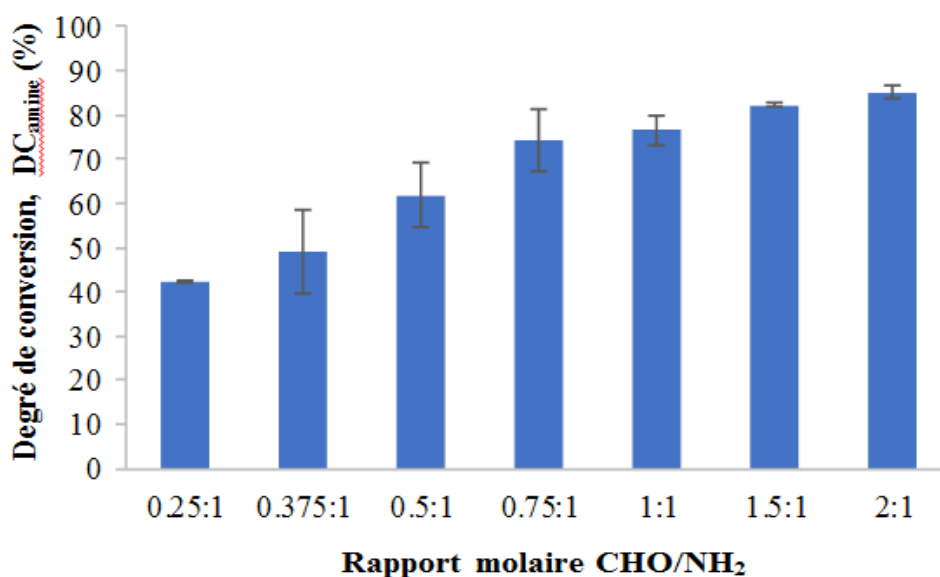


Figure V.15: Variation du degré de conversion DC_{amine} avec le rapport molaire $-\text{CH}=\text{O}/-\text{NH}_2$ des hydrogels à base de CS réticulé avec la CMCOx ($t_{\text{reaction}} = 2.5$ h; $T_{\text{reaction}}=55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=2.4$).

Nous remarquons dans ce cas le fait que la densité de réticulation (donc le degré de réticulation) croît avec l'addition périodique de la quantité de réticulant CMCOx.

Les valeurs de DC_{amine} augmentent lorsque la quantité de CMCOx dans les échantillons est plus élevée, atteignant 85% pour le rapport molaire (2/1). Il a été observé que la valeur DC_{amine} pour l'échantillon P1 dans lequel le rapport molaire de (0,25/1) était de 42,27% et non de 25% comme prévu théoriquement. La valeur étonnamment élevée de DC_{amine} déterminée à l'aide de la réaction avec la ninhydrine ne pourrait s'expliquer que par l'existence de fortes interactions intermoléculaires telles que les liaisons hydrogènes, électrostatiques ou par la complexation du carboxylique avec des groupements amines, qui pourraient capturer les groupes $-\text{NH}_2$ non impliqués dans la base Schiff -la formation de liaisons de base conduisant à une conclusion erronée sur la valeur DC_{amine} . L'effet est maintenu, de moins en moins intense, jusqu'au le rapport molaire CHO / NH₂ de (0,5 / 1) (mol / mol).

Les interactions intermoléculaires mentionnées précédemment diminuent avec l'augmentation de la quantité de CMCOx par la consommation de groupes amines dans la réaction de condensation. D'autres auteurs indiquent également que la possibilité de formation de complexes polyélectrolytiques à $\text{pH} = 2,4$ ou $2,5$. Une étude antérieure de recherche indique que la CMC peut former des complexes polyélectrolytiques à $\text{pH} = 2,4$ avec la gélatine à un rapport gélatine/CMC de 1,7/1. Le nombre de groupes amines qui pourraient interagir électrostatiquement avec les groupes carboxyliques de la carboxyméthylcellulose est

inférieur à $\text{pH} = 2$ par rapport à $\text{pH} = 3$ [291]. Aussi, à $\text{pH} = 2,5$, des complexes polyélectrolytiques à base de CMC et CS ont été préparés, et il a été montré que l'efficacité de leur obtention dépend du rapport entre CMC et CS [292]. La possibilité d'obtenir des complexes polyélectrolytiques à $\text{pH} = 2,4$ a été testée pour élucider si les interactions électrostatiques entre les groupes amines du chitosane et les groupes carboxyliques de CMCOx peuvent être influencés la valeur de DC_{amine} mentionnée ci-dessus.

Trois films ont été préparés à base de CS et de CMC (le polysaccharide non oxydé) pour tester cette hypothèse, en gardant les mêmes quantités de polymères que celles correspondant aux mélanges CS avec CMCOx obtenus à différents rapports molaires -CHO / -NH₂ : P1(0,25/1); P2(0,375/1) et P3(0,5/1). Après séchage des films, les groupes amines ont été déterminés en les dosant avec de la ninhydrine. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau V.2, en gardant les codes initiaux des échantillons, avec la mention que pour le DC_{amine} (%) des films réticulés ont été introduits les notations suivantes ; la notation de DC_{amine} exprime la réticulation chimique et interactions physiques (%) qui composent le pourcentage total de groupes amines a été introduite dans la colonne 3. Pour les non réticulés, les interactions physiques de DC (%) qui expriment le pourcentage des groupes amines impliqués uniquement dans les interactions physiques a été introduit dans la colonne 4.

La dernière colonne montre la différence entre les deux valeurs DC_{amine} pour les échantillons analysés, ce qui donne une image plus réaliste des valeurs de DC_{amine} (%) obtenues strictement par la réticulation chimique qui exprime le pourcentage de groupes amines impliqués uniquement dans la réaction chimique de formation de base de schiff (colonne 5).

Tableau V.2 : Les valeurs de DC_{amine} (%) pour les hydrogels obtenus par réticulation chimiques et l'interaction physique entre le CS et CMCOx, respectivement, par l'interaction des groupements amines de CS avec les groupements carboxyliques de CMC.

Echantillon	Rapport molaire	DC_{amine} (réticulation chimique et interaction physique) (%)	DC (interaction physique) (%)	DC_{amine} (réticulation chimique et interaction physique) – DC (interaction physique) = DC_{amine} (réticulation chimique bae Schiff) (%)
1	2	3	4	5
P1	0.25:1	42.27±0.1	16.47±2.5	25.8
P2	0.375:1	49.05±9.3	17.97±2.3	31.08
P3	0.5:1	61.83±7.3	23.89±3.7	37.94

Une première découverte est qu'en effet, il a été constaté que dans les échantillons non réticulés chimiquement, certains des groupements amines de CS ne participent pas à la réaction avec la ninhydrine, évidemment parce que les groupements amines étaient impliqués dans des interactions stables avec les groupes carboxyliques de CMC. On suppose que le même effet se produit lorsque des échantillons réticulés sont obtenus, c'est-à-dire que certains des groupes amines de CS réagissent avec les groupes carbonyle du CMCOx, et d'autres interagissent avec le groupe carboxylique de CMCOx. Ces interactions peuvent être expliquées les valeurs de DC_{amine} élevées correspondant à ces échantillons, qui n'expriment pas correctement le DC_{amine} des groupes amines en bases de Schiff.

En calculant le DC (%) réticulation chimique base schiff (colonne 5 du tableau V.2), nous obtenons des valeurs beaucoup plus proches de la réalité de la participation des groupes NH_2 dans la réaction de réticulation. Par exemple, pour l'échantillon P1, cette différence était de 25,8% , étant donné que le rapport molaire était de (0,25/1). La valeur théorique maximale de DC_{amine} correspondant étant de 25%, selon le rapport molaire des groupes fonctionnels impliqués dans la réaction de réticulation de l'échantillon P1 (0,25 mole de $-CH = O$ pour 1 mole de $-NH_2$). De même, pour l'échantillon P2, le DC (%) réticulation chimique base schiff était de 31,08%, étant donné que le rapport molaire entre ces deux types de groupes fonctionnels était de (0,375/1). Pour le dernier échantillon P3, correspondant à un rapport molaire de 0,5 mole de groupes $-CHO$ pour 1 mole de groupes $-NH_2$, sa valeur était de 37,94% (par rapport à la valeur théorique maximale de 50%).

Une fois la consommation élevée de groupements amines avec l'augmentation du rapport molaire entre les groupes fonctionnels impliqués dans la réaction de réticulation chimique et l'augmentation du degré de réticulation pourrait nous conduire à la conclusion que l'interaction entre les groupes $-NH_2$ n'ayant pas réagi de CS avec $-COOH$ de CMCOx pourrait être diminuée lorsque le rapport molaire augmente. Par conséquent, à un rapport molaire supérieure à 0,75/1 de (CHO/ NH_2), la valeur de DC_{amine} reflète précisément la réaction entre les groupes amines de CS avec les groupes aldéhydes de CMCOx par la formation de base de Schiff. Suite aux données présentées sur la figure V.15, on constate que pour l'échantillon P4, les valeurs DC_{amine} se rapprochent de la valeur théorique et continuent d'augmenter légèrement avec la valeur du rapport molaire pour les échantillons P5-P7, sans atteindre le maximum de 100%, même si la teneur en groupes carbonyles des échantillons étaient dans certains cas en excès. En principe, cet effet n'est pas possible non plus. La réduction drastique de la mobilité des fragments de chaîne entre les nœuds de réseau réticulés

obtenus et la possibilité de l'interaction des groupes fonctionnels dans la réaction de réticulation a été réduite.

Il est à noter que les liaisons intermoléculaires (physiques ou complexées) sont réversibles et peuvent être facilement clivées par rapport aux liaisons chimiques irréversibles [293]. Ainsi les bases de Schiff peuvent stabiliser l'hydrogel obtenu à base de CS et CMCOx, mais il existe même dans le cas de ces liaisons la possibilité d'une dégradation hydrolytique en solution aqueuse. Lü et al. ont montré que la dégradation des hydrogels après 24 heures a été diminuée en intensité à mesure que le degré de réticulation augmente parce que les molécules d'eau ne peuvent pas entrer dans le réseau polymère réticulé, et donc la dégradation est diminuée [294].

V.3.4.2. Influence du temps

En vue de voir l'influence du temps sur le taux de réticulation chimique et les interactions physiques des films hydrogels à base de CS et de CMCOx de type P2 à un rapport molaire de (0,375/1) pour une température de réticulation de 55 °C, on a élaboré plusieurs films en différentes périodes de temps de réticulation lors de la préparation (1h, 2h, 3h, 4h, 5h et 6h). La variation de DC_{amine} des groupements amines en fonction du temps de réticulation pour les films obtenus est illustrée à la figure V.16.

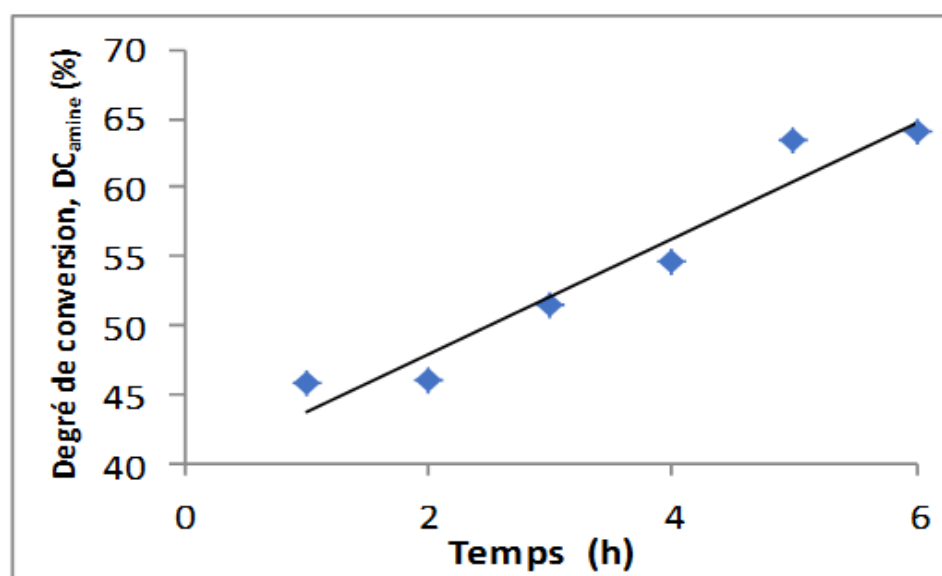


Figure V.16: Influence de temps sur le DC_{amine} (rapport molaire $-\text{CH}=\text{O}/-\text{NH}_2 = 0,375/1$, $T=55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=2.4$).

Il a été constaté que le DC_{amine} (%) augmente avec la croissance du temps de réticulation, probablement même pour des durées supérieures à 6 h, atteignant une valeur maximale de 64% après 6 heures. Compte tenu de la valeur initiale du rapport molaire $-\text{CHO} / -\text{NH}_2$, seuls 37,50% du total des groupements amines peuvent réagir avec ceux aldéhydiques dans CMCOx. Il en résulte que 26,5% des groupements amines totaux du CS sont impliqués dans des interactions intermoléculaires telles que l'hydrogène ou les liaisons électrostatiques, leur nombre étant légèrement plus élevé lorsque le temps de réticulation augmente.

Bien entendu, l'augmentation de DC_{amine} avec le temps de réticulation peut être provoquée à la fois par l'augmentation du nombre de liaisons chimiques de type imine entre les chaînes et par le nombre d'interactions intermoléculaires de nature physique. En outre, la valeur de pK_a des groupes carboxyliques dans CMCOx est de 3,5: à une valeur de pH inférieure, des liaisons hydrogènes peuvent se former qui bloquent les groupements $-\text{NH}_2$, les empêchant de réagir avec la ninhydrine. Dans notre cas, le pH du milieu de réticulation était de 2,4. Leur nombre peut augmenter à mesure que le temps de contact des polymères augmente à une température de 55 °C. Les résultats sont concordants avec ceux obtenus lors de l'analyse de l'influence du rapport molaire sur le DC_{amine} en utilisant le test à la ninhydrine.

A la fin de cette étude, on peut conclure qu'il est possible d'obtenir des films à caractère d'hydrogel à base de chitosane et CMCOx, avec des degrés variés de réticulation en fonction des applications biomédicales désirées, en jouant sur les paramètres de la réaction de réticulation.

V.3.4.3. Influence de la température

Afin d'évaluer l'influence de la température de réticulation sur le taux de réticulation, le même test avec la ninhydrine a été utilisé. Cinq films d'hydrogels ont été préparés à base de CS et de CMCOx, à un rapport molaire de $-\text{CH}=\text{O}/-\text{NH}_2 = 0,375/1$, pour une durée de réaction de 3 heures. La réticulation a été effectuée à différentes températures (20°C, 30°C, 40°C, 50°C et 60°C). L'influence de la température sur les valeurs de DC_{amine} (%) est représentée dans la figure V.17.

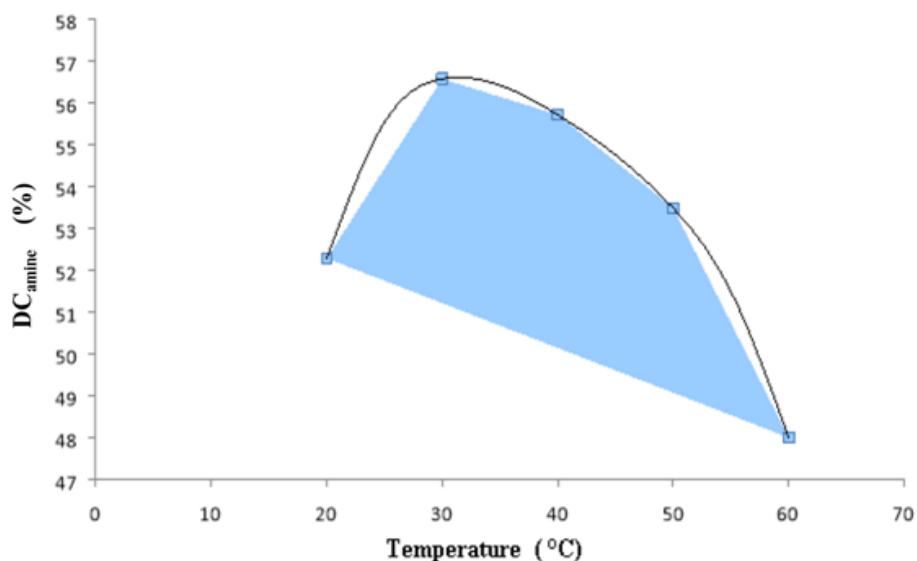


Figure V.17: Influence de la température sur le DC_{amine} (rapport molaire $-CH=O/-NH_2 = 0,375/1$, $t_{réaction} = 2,5$ h, $T_{réaction}=55^{\circ}C$, $pH=2.4$).

D'après la figure V.17, on remarque que le DC_{amine} atteint une valeur maximale à la température de $30^{\circ}C$, et commence ensuite à diminuer. Il atteint une valeur minimale à $60^{\circ}C$. La plage de variation de DC_{amine} sur cette plage de température n'est pas très élevée, avec un maximum de 8%, mais les valeurs restent supérieures à la valeur théorique, d'une valeur maximum de 37,5%. On s'attendrait à ce que le DC_{amine} augmente continuellement avec la température (ce qui influence positivement les réactions chimiques), mais, d'autre part, l'augmentation de ce paramètre a pour effet de cliver les liaisons physiques ou hydrogènes entre les groupes fonctionnels au sein des polymères. Par conséquent, la ninhydrine réagira avec un nombre croissant de groupements amines libérés de leurs interactions physiques, et la valeur de DC_{amine} sera réduite. Cependant, il faut noter que même si la température atteint $60^{\circ}C$, toutes les connexions physiques n'ont pas été coupées, la valeur apparente de DC_{amine} étant toujours supérieure à la valeur théorique de 37,5%. L'étude des facteurs d'influence présentée précédemment nous a permis d'obtenir des informations importantes, qualitativement, sur les conditions les plus favorables pour l'obtention de films d'hydrogel avec l'application dermatologique.

On peut conclure que la température a une influence positive que jusqu'à $30^{\circ}C$, probablement due à la réactivité plus élevée du groupement carbonyle du CMCOx. Aux températures supérieures, la réactivité diminue et conduit aux valeurs de plus en plus faibles du DC_{amine} %.

V.4. Caractérisation des films obtenus à base de chitosane et CMCOx

Les films à caractère d'hydrogels préparés ont été caractérisés par les différentes techniques tel que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier à l'état solide (FTIR), la microscopie électronique à balayage (MEB), l'analyse thermogravimétrique (ATG), la résistance mécanique et l'étude de gonflement dans des fluides biologiques...etc

V.4.1. Analyse spectrale FTIR des films obtenus (CS/CMCOx)

Pour obtenir des informations sur la structure des hydrogels synthétisés, nous avons analysé le CS, la CMCOx pendant 6 heures et le film P2 à un rapport molaire (0.375/1), les spectres FTIR enregistrés étant discutés par comparaison avec ceux des polymères de départ (le chitosane) et du réticulant (CMCOx), qui peuvent être limités uniquement à la plage de nombre d'ondes entre 1888 et 600 cm^{-1} , où les différences étaient attendues. Les spectres sélectionnés pour l'analyse sont présentés dans la figure V.18.

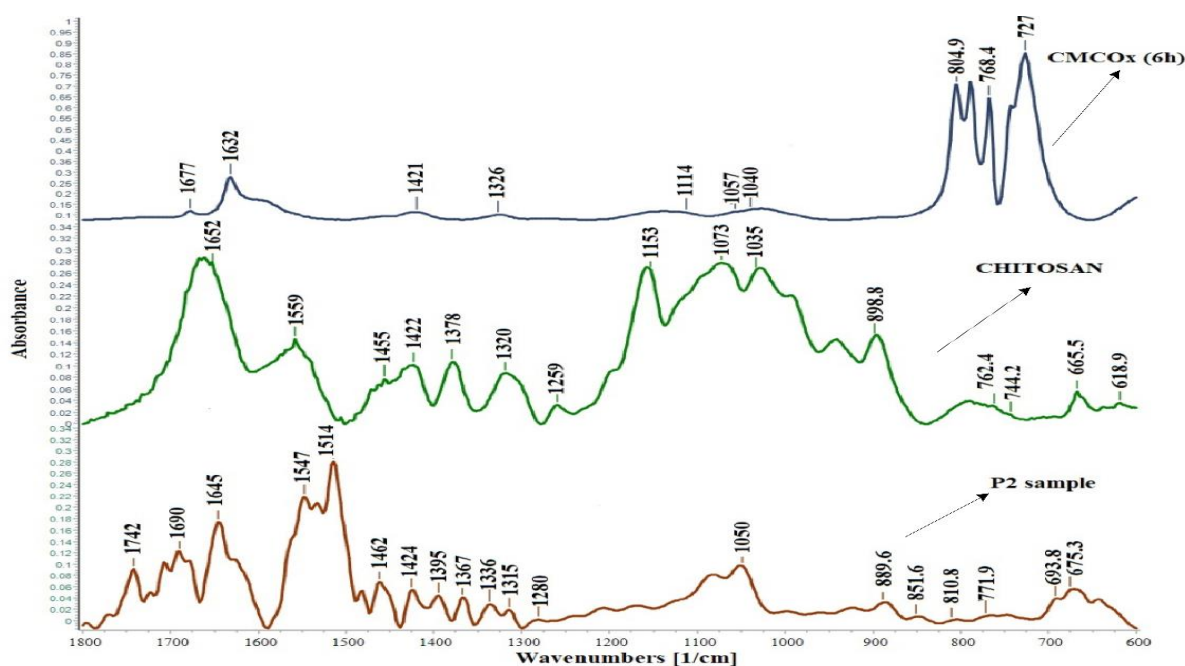


Figure V.18: Spectres infrarouges du chitosane, de la Carboxyméthylcellulose oxydée et de film P2 (CMCOx/CS) avec un rapport molaire ($-\text{CH}=\text{O}/-\text{NH}_2 = 0,375/1$).

Chitosane

Le spectre infrarouge du chitosane est représenté dans la figure V.18. La bande d'absorption à 3501 cm^{-1} est attribuée aux vibrations d'élongation des $-\text{NH}_2$, NH -primaire et $-\text{OH}$. Les pics à 2976 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} et 1372 cm^{-1} sont dus aux vibrations d'élongation et de déformation de la liaison C-H aliphatique [295]. Il apparait également sur le spectre de deux pics d'absorption d'intensité moyenne à 1649 cm^{-1} (vibration de flexion) et 1541 cm^{-1} qui

correspondent à l'élongation de la double liaison C=O des amides et à la déformation angulaire (cisaillement) de la liaison N-H des amines, respectivement.

Le pic d'absorption à 1317 cm^{-1} correspond à la vibration complexe d'élongation du groupe NH-CO (bande d'absorption amide III) des groupements latéraux et le pic d'absorption à 3501 cm^{-1} appartient au groupe $-\text{NH}_2$ étant attribué aux amines primaires, et pour la bande d'absorption à 1077 cm^{-1} est attribuée à la liaison C-O-C dans le groupe glycosidique [296].

Hydrogel à base de Chitosane/ Carboxyméthylcellulose oxydée.

La liaison imine (également appelée imine, $-\text{N}=\text{CH}-$), communément appelée base de Schiff, est la liaison covalente la plus fréquemment utilisée pour la création d'hydrogels à base de chitosane. Les groupes aldéhydes peuvent former des liaisons imines covalentes avec les groupes amines du chitosane.

Nous remarquons d'après la figure V.18, dans le spectre de l'hydrogel (P2), l'apparition d'un nouveau pic à 1645 cm^{-1} , 1690 cm^{-1} ou 1742 cm^{-1} et le pic de 1320 cm^{-1} du spectre de chitosane a été déplacé à 1336 cm^{-1} et divisé dans de nombreux autres pics d'intensité inférieure par rapport au spectre CS, probablement en raison de la consommation des groupements amines libres, ce qui indique la formation de la base schiff après réticulation du chitosane par la CMCOx. Ces résultats sont en accord avec les travaux menés par Anjali Teotia et al (2012) [119]. La littérature indique que la bande d'absorption caractéristique du groupe imine ($\text{CH}=\text{N}$) vers ($1660\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$) ne peut pas être observée clairement, probablement parce qu'elle chevauche la bande d'absorption de l'amide I du chitosane pour le spectre du chitosane [297]. Le pic caractéristique des groupes aldéhydes à partir de 1677 cm^{-1} dans le spectre CMCOx semble décalé dans le spectre du film d'hydrogel P2 (CS/CMCOx) à environ 1690 cm^{-1} . Ce déplacement est le résultat de la formation de nouveaux groupements tels que l'imine ou l'amide, en vue de créer des interactions possibles entre les groupes amines et aldéhydes avec la possibilité de formation de bases de Schiff ($-\text{C}=\text{N}$). La bande caractéristique du chitosane à partir de 1559 cm^{-1} est déplacée dans le spectre de l'échantillon P2, et plusieurs pics d'intensités plus faibles sont observés, ce qui peut indiquer certaines interactions intermoléculaires des groupes amines [298]. Le pic d'absorption à partir de 1514 cm^{-1} peut être attribué à la vibration d'étirement des groupes ($\text{C}=\text{C}$) ou ($\text{C}=\text{N}$) [276, 299, 300].

On observe également que la bande d'absorption à 3501 cm^{-1} dans le CS a une intensité plus faible dans le spectre du film d'hydrogel, ce qui indique que la réaction de réticulation a bien eu lieu. La bande d'absorption de 1742 cm^{-1} indique la dissociation

électrolytique du groupe $-\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$ et se produit, en particulier dans les complexes de polyélectrolytes. La littérature indique que cette bande d'absorption est plus forte si la consommation des groupes amines s'intensifie [301]. Visuellement, le changement de couleur jaune des films d'hydrogel est dû à la liaison imine formée par la condensation des deux types de groupes fonctionnels [302].

V.4.2. Analyse de la morphologie des films par microscopie électronique à balayage (MEB)

Nous avons également procédé à l'analyse morphologique de la surface des hydrogels synthétisés en utilisant la microscopie électronique à balayage (MEB). Pour mettre en évidence l'influence du degré de réticulation sur la morphologie des films, nous avons sélectionné les échantillons P1 et P3. Les photos obtenues de films hydrogels à base de (CMCOx/CS) en différents rapports molaires P1 (0.25/1) et P3 (0.5/1) sont représentées dans la figure V.19. La photographie MEB de l'hydrogel montre clairement la texture et la nature rugueuse des films d'hydrogel.

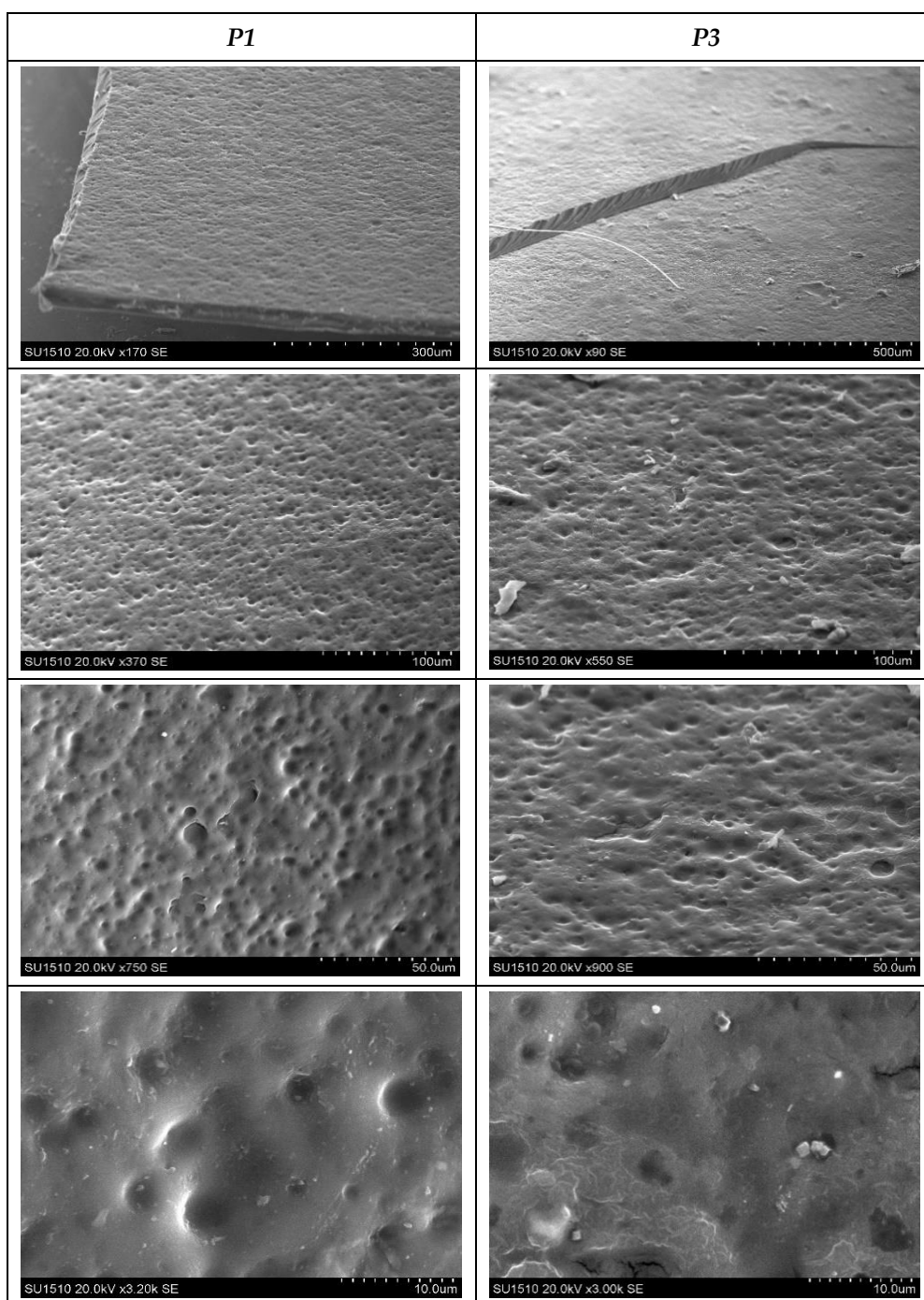


Figure V.19: Photographies MEB pour les échantillons P1 et P3.

On constate une petite différence de porosité entre les films préparés avec différents taux de carboxyméthylcellulose oxydée (CMCOx) ajoutés. Il est à noter que la porosité et la rugosité s'améliore avec la réduction de la quantité de CMCOx ajoutée. Comme on peut le voir sur la figure V.19, la surface des films présente une morphologie compacte et homogène, suggérant une bonne miscibilité et homogénéité entre ses composants.

Nous constatons que même si les différences concernant la rugosité de films ne sont pas très grandes, on peut dire que les films P3 (0.5/1) sont un petit peu moins rugueux et moins poreux que les films P1(0.25/1). Ces hydrogels peuvent être considérés comme microporeux. Ces résultats montrent que la porosité des hydrogels diminue avec l'addition du (CMCOx), et dans le sens avec l'amélioration de la densité de réticulation des films analysés par un nombre plus élevé de groupes aldéhydes employés en réaction avec les groupes aminés de CS.

En conclusion, on peut dire que la microscopie électronique à balayage (MEB) nous a permis de confirmer que le développement de la texture poreuse des hydrogels est en relation inverse aux taux de CMCOx ajouté.

V.4.3. Propriétés thermiques des films

Nous avons procédé à l'analyse thermique (ATG) des films hydrogels de chitosane et de différents taux de CMCOx ajouté.

L'analyse thermogravimétrique a été utilisée pour évaluer la stabilité thermique et pour déterminer la température de décomposition des films analysés. Cette analyse est utile, aussi, ayant en vue les applications biomédicales de ce type de matériaux ; elle nous confirme si on peut envisager la stérilisation par voie thermique de ceux-ci, sans les dégrader.

V.4.3.1. Analyse thermique différentielle (ATG)

La technique thermogravimétrique (TGA) est couramment utilisée dans la recherche pour déterminer les caractéristiques thermiques des matériaux et des polymères. Elle a été utilisée pour évaluer les caractéristiques thermiques des films d'hydrogels pour l'hypothèse qu'ils seraient soumis à une stérilisation thermique avant l'application de peau. La technique TGA aide à établir les températures de dégradation, la teneur en humidité et le pourcentage de composants de matières inorganiques et organiques. Les thermogrammes des échantillons CS, CMCOx, les films P2 et P3 sont illustrés dans la figure V.20.

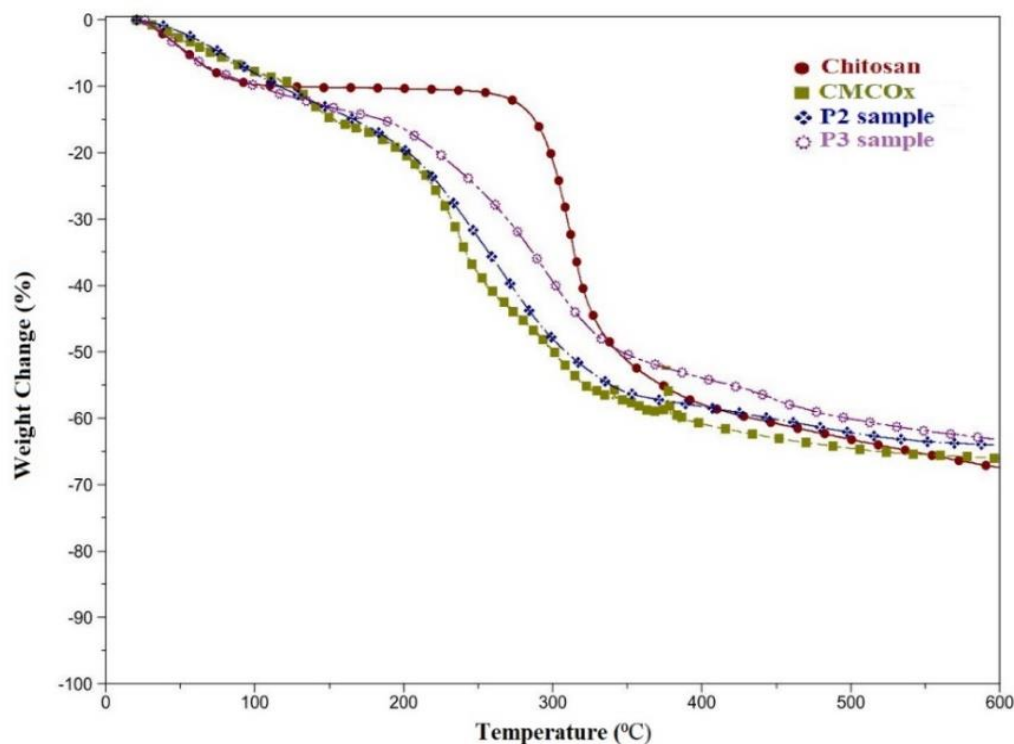


Figure V.20 : Courbes thermogravimétriques pour les échantillons CS, CMCOx, les films (P2 et P3).

Dans le cas du CS, deux étapes distinctes de perte de masse ont été observées. La première se produit entre 20 et 98,34 °C. Elle correspond à une perte de masse de 10%, suite à l'évaporation de la quantité d'humidité à la macromolécule. La seconde étape de la perte de masse commence à 277,4 °C jusqu'à 384 °C, soit 56,35%, correspond à l'étape de décomposition du CS; le poids résiduel de CS était de 27,04 % à 800 °C. Dans le cas du thermogramme de CMCOx, on observe que la perte de masse est environ 10,7 % dans la plage de température qui comprise entre 20 °C jusqu'à 135.9 °C.

La dégradation du polysaccharide commence à la température de 135.9 °C et se termine à 385 °C. L'analyse thermogravimétrique montre deux étapes de décomposition thermique entre les plages suivantes: 135,9 °C à 238,3 °C (29,4% de perte de masse) et 238,3°C à 385 °C (53,11% de perte de masse). Après ces intervalles de température, la perte de masse était plus lente par rapport à celle mentionnée ci-dessus et la quantité de résidu à 800°C est de 27,76 %. On peut dire que les résultats thermogravimétriques montrent que la CMCOx obtenue par la réaction d'oxydation en présence de NaIO₄ était hygroscopique et que la résistance thermique est plus faible par rapport à celle du CS. La vitesse de dégradation de la CMC oxydée s'avère plus rapide que celui du CS. Des recherches antérieures ont été effectuées par Benghanem et al. Ont démontré que la CMC est donc jugée possédant une

stabilité thermique meilleure que celle la CMCOx ; Le poids résiduel obtenu de la CMC était de 43,95% comparé à celui de la CMCOx qui est estimé à 30,92% [302].

Toutefois, au cours du chauffage de l'échantillon P2, deux étapes sont également observées. Il a été observé que la première étape se situe entre 20,0 °C et 93,5 °C, ce qui montre environ 8,11 % de la perte de masse. Ceci est probablement dû à l'évaporation de l'eau. La deuxième partie de dégradation, avec une perte de masse égale à 65,4 % commence immédiatement et se termine à 384 °C. Les thermogrammes pour l'échantillon P2 montrent un stade intermédiaire entre 93,5 °C et 163,5 °C où la perte de masse observée était de 19,33% , qui se produit en raison d'une décomposition thermique ou d'une perte d'humidité. Le poids résiduel du film P2 était de 27,35 %.

Pour le dernier échantillon P3, on observe que la perte de masse, notamment l'eau, a lieu entre 20 °C et 79,9 °C, atteindre 8,14 %. L'étape de dégradation commence immédiatement à 207 °C et se termine à 352,20 °C et la perte de masse était de 50,15%. Il existe une étape intermédiaire pour l'échantillon P3 entre 79,9 °C et 207 °C, où l'échantillon peut perdre une masse en raison de la décomposition thermique ou de la perte d'humidité. La perte de masse totale de l'échantillon à cette étape intermédiaire était de 17,29 %. Le poids résiduel de l'échantillon P3 à environ 10% est plus élevé que celui de l'échantillon P2. Les thermogrammes montrent des pertes de masse de 65,4 % jusqu'à 384 °C pour l'échantillon P2 et d'environ 50,15 % pour l'échantillon P3, et la résistance à la température la plus élevée de l'échantillon P3 est due à sa structure plus stable, qui peut être déterminée par un degré de réticulation plus élevé.

L'analyse des résultats de la figure V.20 montre que la stabilité thermique des films est intermédiaire à celle des polymères constitutifs, ainsi que les courbes de perte de masse avec la température se situant entre celles correspondant au CS et CMCOx. La résistance thermique des échantillons analysés était supérieure à celle du CMCOx, étant déterminée par la réticulation entre les chaînes «polymères» des constituants. Un argument en faveur de cette affirmation est que l'échantillon P3, obtenu à un rapport molaire $-CH=O / -NH_2$ supérieur pour l'échantillon P2, à une stabilité thermique plus élevée (perte de masse moindre à la même température de décomposition).

V.4.4. Propriétés mécaniques des films

V.4.4.1. Essais mécaniques de traction

L'application biomédicale de ce type de films sous forme de pansement, par exemple, exige une certaine résistance mécanique. Pour avoir d'informations sur les propriétés mécaniques (à traction), ont été enregistrées les courbes contrainte-déformation sur différents films qui diffèrent par leur composition. Le module de Young, la déformation et la contrainte à la rupture mis en jeu pour rompre l'échantillon sont aussi calculées pour certains échantillons étudiés. La figure V.21 montre les courbes de contrainte-déformation obtenues à partir de différents films d'hydrogels synthétisés par les différents rapports molaires entre le CS et la CMCOx ajoutée.

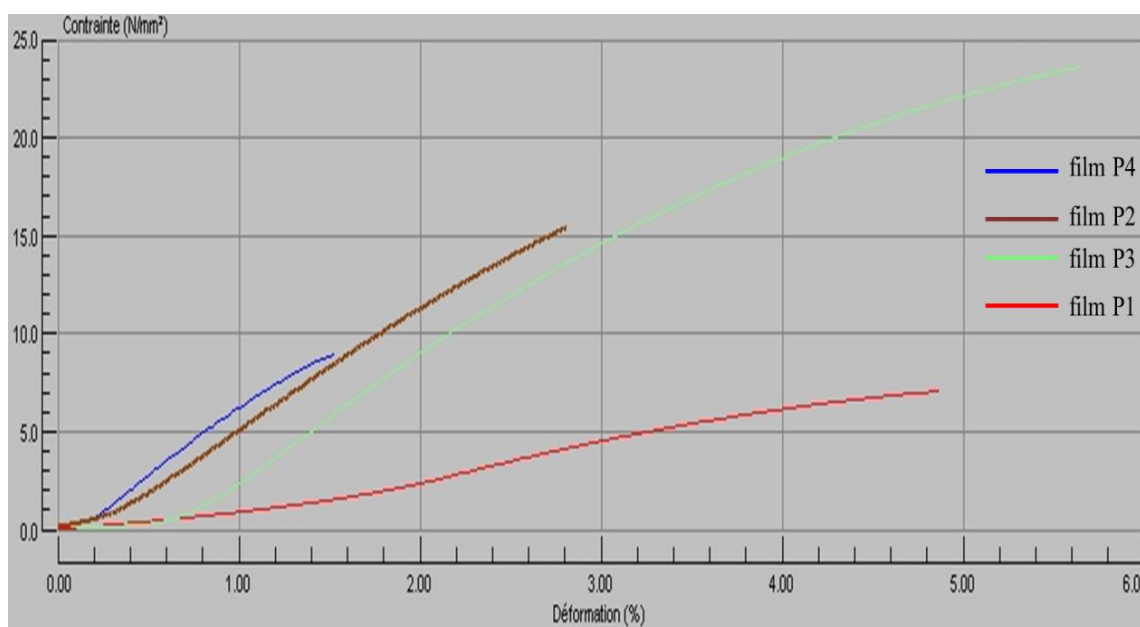


Figure V.21 : Les courbes de contrainte à la rupture en fonction de la déformation des différents films hydrogels préparé à base du chitosane réticulé par la CMCOx.

A base de ces courbes, les valeurs des caractéristiques mécaniques des films ont été calculées, et surtout le module de Young qui donne les informations les plus pertinentes sur la rigidité de ceux-ci. Ces valeurs sont présentées dans le tableau V.3.

Tableau V.3: Variations des caractéristiques mécaniques (Valeurs moyennes) des différents films hydrogels sec à base de CMCOx/ chitosane en différents rapports molaires : P1 (0,25/1), P2 (0,375/1), P3 (0,5/1) et P4 (0.75/1).

Echantillon	Force max (N)	Allongement à la rupture (mm)	Déformation à la rupture (%)	Largeur (mm)	Épaisseur (mm)	Contrainte à force max. (N/mm ²)	Module de Young (N/mm ²)
P1	37,622	0,73	4,863	13	0,41	7,059	142,826
P2	25,838	0,422	2,812	13	0,129	15,407	650,813
P3	40,551	0,857	5,647	13	0,132	23,631	645,401
P4	19,11	0,228	1,52	10	0,215	8,888	734,727

Avec l'augmentation de la quantité de carboxyméthylcellulose oxydée, les valeurs de la déformation baissent, montrant une augmentation de la rigidité du film d'hydrogel pour une réticulation plus élevée ; exception faite le film P3, pour lequel nous n'avons pas une explication plausible.

D'après le tableau V.3, on observe que lorsque la quantité de la CMC oxydée augmente, le module de Young augmente, en exceptant aussi l'échantillon P3.

Les échantillons soumis à cet essai montrent que les films P4 manifestent un faible allongement, sont rigides, mais le module de Young présente la valeur la plus élevée. Évidemment, l'explication est liée au degré de réticulation des films, qui augmente avec le taux de CMCOx utilisé comme réticulant ; l'effet est, bien sûr, l'augmentation de la rigidité des films avec ce paramètre, la mobilité des chaînes des deux polymères étant de plus en plus diminuée par l'augmentation de la densité de réticulation, donc par la diminution de la longueur de segments des chaînes entre deux noeuds du réseau. Évidemment, l'élasticité des films diminue par l'augmentation du degré de réticulation.

V.4.5. Capacité des films d'hydrogel à absorber les solutions aqueuses

Le comportement des films à base de biomatériaux ou films d'hydrogels, dans des fluides physiologiques est important pour leurs applications biomédicales. Ce comportement détermine d'une part la capacité des films d'être chargés avec des médicaments, et d'autre part influence également le transport de ces médicaments par le réseau polymère, ce qui va influencer la cinétique de libération du principe actif.

L'étude de la capacité de gonflement des hydrogels en milieu aqueux a été réalisée par la méthode gravimétrique, comme cela a été indiqué dans la section IV.6.8.

L'influence du rapport molaire CHO / NH₂, du temps de réticulation et de la température de réticulation sur les valeurs du degré de gonflement a été étudiée et suivie par des milieux aqueux, à deux valeurs du pH pour établir les paramètres optimaux pour l'obtention d'hydrogels biocompatibles pour une libération contrôlée et prolongée de principes actifs avec des applications transdermiques.

V.4.5.1. Influence de la température de réticulation sur le degré de gonflement des films

Afin de voir l'influence de la température de réticulation sur le taux de gonflement (exprime indirectement par DC_{amine}) dans les solutions tampons, les hydrogels ont été pesés et immergés dans une solution tampon acétate pH = 5,5 (ABS), ainsi que dans une solution tampon phosphate pH = 7,4 (PBS). On a déterminé le degré de gonflement à des intervalles du temps bien établis.

Le degré de gonflement a été déterminé par gravimétrie à des intervalles de temps bien établis jusqu'à l'équilibre. Nous avons choisi pour cette étude le film P2, et nous avons analysé quatre films de ce type obtenus par réticulation à différentes températures entre 30 °C et 60 °C, du point de vue du processus de rétention de l'eau. L'étude de la cinétique de gonflement des quatre films hydrogels dans les deux milieux (pH = 7.4, pH = 5.5) est représentée dans les figures V.22 (a) et V.22 (b).

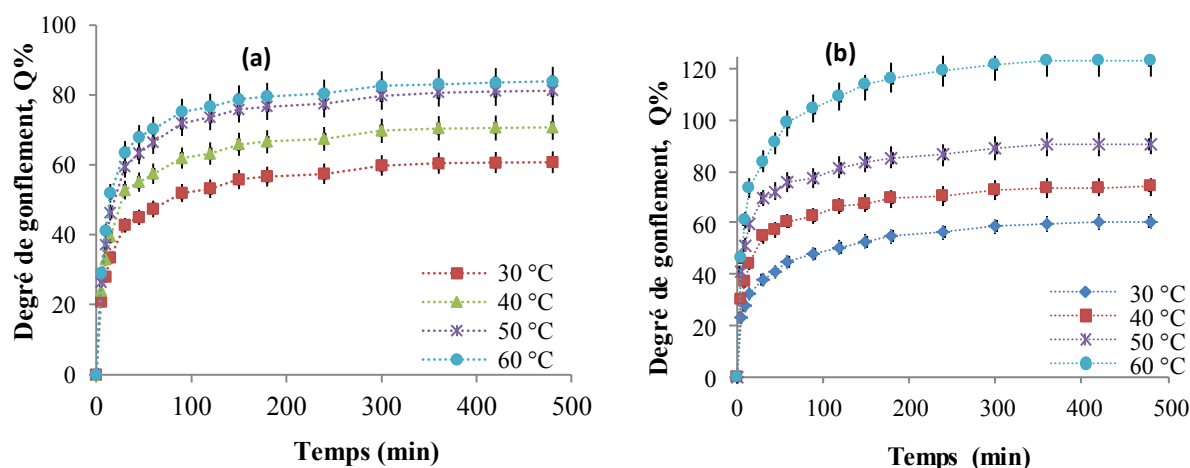


Figure V.22 : La variation avec le temps du degré de gonflement pour les films de type P2 obtenus à différentes températures de réticulation (temps de réticulation = 3 h) dans une solution tampon acétate, pH = 5,5 (a) et dans une solution tampon phosphate à pH = 7,4 (b).

L'examen de la figure V.22 (a) comme première observation nous permet de vérifier que les films préparés à différentes températures présentent une capacité élevée de rétention de l'eau à $\text{pH} = 5,5$, et les valeurs du degré maximal de gonflement dépendent de la température de réticulation. Le gonflement est pratiquement instantané lorsque les échantillons obtenus sont immergés dans des solutions aqueuses, déterminé bien sûr par le caractère fortement hydrophile du chitosane. Dans le même temps, la présence de groupements amines protonés en milieu acide faible conduit à des répulsions électrostatiques entre les cations ammonium formés, l'effet étant la distance des segments de chaîne entre les nœuds de réticulation et, par conséquent, la diffusion de la quantité d'eau accrue dans le réseau polymère. Nous pouvons constater une évolution logique du degré maximal de gonflement avec le temps plus accéléré au cours de la première heure, puis plus lentement dans l'intervalle de temps de 1h jusqu'à 3 heures avec une tendance à atteindre un plateau vers 8 h. Le degré de gonflement dépend, on voit bien, de la température d'obtention des hydrogels.

En accord avec l'évolution de DC_{amine} , l'augmentation de la température après 30°C détermine la diminution du degré de gonflement, en parfaite concordance avec l'évolution du degré de réticulation, respectivement le DC_{amine} (voir fig. V.17).

Comme il existe de fortes interactions physiques entre les chaînes de CS (responsables du blocage partiel des groupements amines qui ne peuvent plus réagir avec la ninhydrine), on pourrait en conclure que ces interactions physiques agissent comme une réticulation supplémentaire. Ces interactions diminuent en intensité à mesure que la température de réticulation augmente (voir le paragraphe V.3.4.3), et les valeurs de degré de gonflement dans les solutions aqueuses augmentent.

La même évolution du degré de gonflement est enregistrée pour les films gonflés dans un milieu faiblement basique ($\text{pH}=7,4$) (figure 22 b). Évidemment, l'explication est la même que dans le cas antérieur, responsable de cet effet étant le degré de réticulation des films.

Aux valeurs de température supérieures à 40°C , on constate, aussi, que les valeurs du degré de gonflement atteintes en milieu faiblement basique sont plus élevées qu'en milieu acide. L'explication est la suivante. En principe, le degré de gonflement dépend du taux de réticulation en diminuant avec sa croissance. Mais il peut être influencé, aussi, par la hydrophilie de partenaires qui composent l'hydrogel, et surtout par la présence des groupements capables d'ionisation dans des milieux des valeurs différentes du pH. Dans les hydrogels obtenus, on a encore des groupements $-\text{NH}_2$ pas réagis, provenant de chitosane,

ainsi que des groupements -COOH provenant de la CMCOx. Par l'augmentation de la quantité des CMCOx dans la composition de l'hydrogel, on obtient évidemment des films plus réticulés, dont le degré de gonflement devrait diminuer avec ce paramètre.

Dans un milieu basique, même si le taux de réticulation augmente avec la quantité de CMCOx, les répulsions électrostatiques entre les groupements -COO⁻ qui se forment deviennent très fortes et provoquent l'éloignement des chaînes et, donc, l'augmentation de la taille des mailles du réseau, ce qui a pour conséquence l'augmentation du degré de gonflement [303]. L'effet final sera, donc, la résultante de deux effets contraires : degré de réticulation respectivement le taux des groupements carboxylate apportés par la CMCOx. Le deuxième effet est, apparemment, le plus fort.

A base de ces résultats on peut conclure, aussi, que nos hydrogels sont sensibles aux pH, donc peuvent être encadrés dans la catégorie des hydrogels intelligents.

V.4.5.2. Influence du temps de la réticulation sur le degré de gonflement

Comme nous avons déjà précisé dans un paragraphe antérieur (V.3.4.2), la durée de la réaction de réticulation provoque des valeurs DC_{amine} plus élevées des groupements amines et détermine l'augmentation du taux de réticulation même si des interactions intermoléculaires importantes telles que des liaisons hydrogène et des interactions électrostatiques se produisent en même temps, effet tout à fait normal. Par conséquent, nous avons étudié l'influence de temps sur le degré de gonflement dans les solutions tampons des hydrogels de type P2. Ces hydrogels ont été élaborés à différentes périodes de temps de réticulation lors de la préparation (1h, 2h, 3h, 4h, 5h et 6h). On a établi la cinétique de gonflement en deux solutions tampon (pH =7.4 et pH =5.5). Les résultats obtenus sont regroupés dans les figures V.23 (a) et V.23 (b).

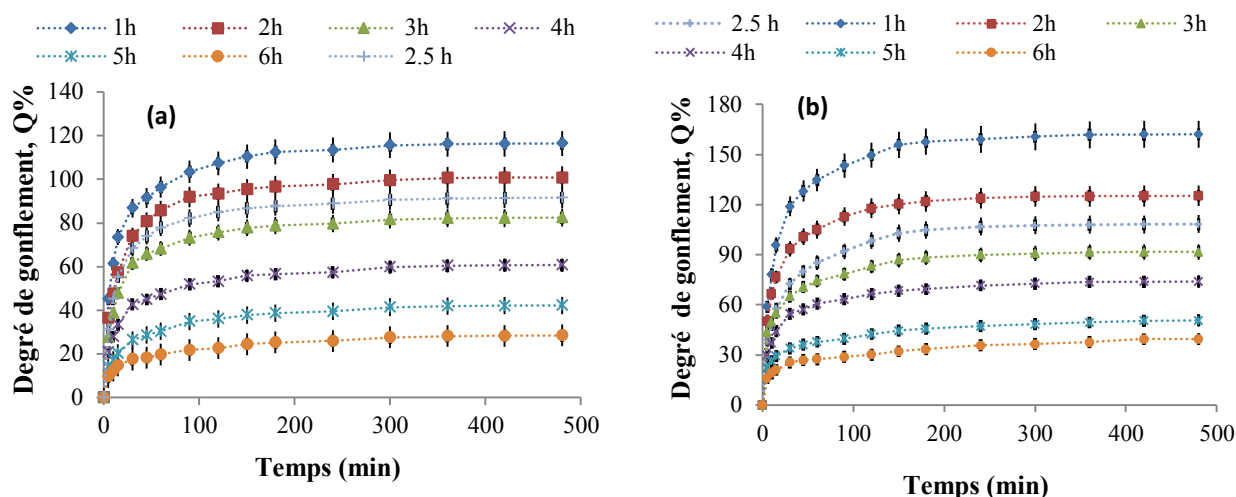


Figure V.23: Variation avec le temps du degré de gonflement pour les films de type P2 obtenus à différents temps de réticulation dans deux milieux différents: a) pH = 5,5 et b) pH = 7,4. ($T_{\text{réaction}} = 55^{\circ}\text{C}$).

La durée de la réaction de réticulation, évidemment accompagnée de l'augmentation de la densité du réseau, réduit les valeurs de degré de gonflement dans les solutions tampons aqueuses. On peut constater une fois de plus l'allure des courbes de gonflements typique pour les hydrogels. Le gonflement est rapide pendant les premières environ 30 minutes, suivi d'une période plus lente et finalement une tendance de se stabiliser, après environ 3h. Le temps de réticulation a une influence importante sur ce comportement. Comme on peut remarquer dans la fig. V.23, le taux de gonflement sur toute la période étudiée et bien sur le taux maximal de gonflement atteint après 8h, diminuent avec l'augmentation de la durée de réticulation. Une telle évolution est logique du degré de gonflement avec le temps de réticulation étant donné que le DC_{amine} des groupements amines dans les bases de Schiff augmente, et par l'implication un nombre plus élevé de groupes aldéhyde de CMCOx ont réagies dans la réaction avec les groupements $-\text{NH}_2$ de CS, provoquant la formation du réseau polymère de plus en plus dense.

Le caractère pH sensible de nos hydrogels se relève une fois de plus si on analyse les résultats présentés dans la fig. V.23 (b). On observe que, indifféremment de la durée de réticulation, le taux de gonflement est supérieur dans le milieu faiblement basique (pH = 7,4); l'explication a été offerte dans le paragraphe antérieur.

D'autre part, on vérifie encore que l'augmentation de la durée de réticulation a pour effet la diminution du taux maximal de gonflement, atteint après environ 8 heures.

V.4.5.3. Influence du rapport molaire -CHO/-NH₂ sur le degré de gonflement

Étant donné que la densité de réticulation, respectivement le degré de réticulation de nos hydrogels s'est avéré être influencé par la quantité de réticulant utilisé, on a voulu vérifier cet effet en étudiant la cinétique de gonflement, dans les mêmes deux milieux de pH différent, pour les hydrogels P1, P2 et P3 obtenus à différentes valeurs du rapport molaires (-CHO/NH₂). Les résultats obtenus de la cinétique de gonflement avec le temps de ces hydrogels dans les solutions tampons (pH = 5.5 et pH = 7.4) sont regroupés dans les figures V.24 (a) et V.24 (b).

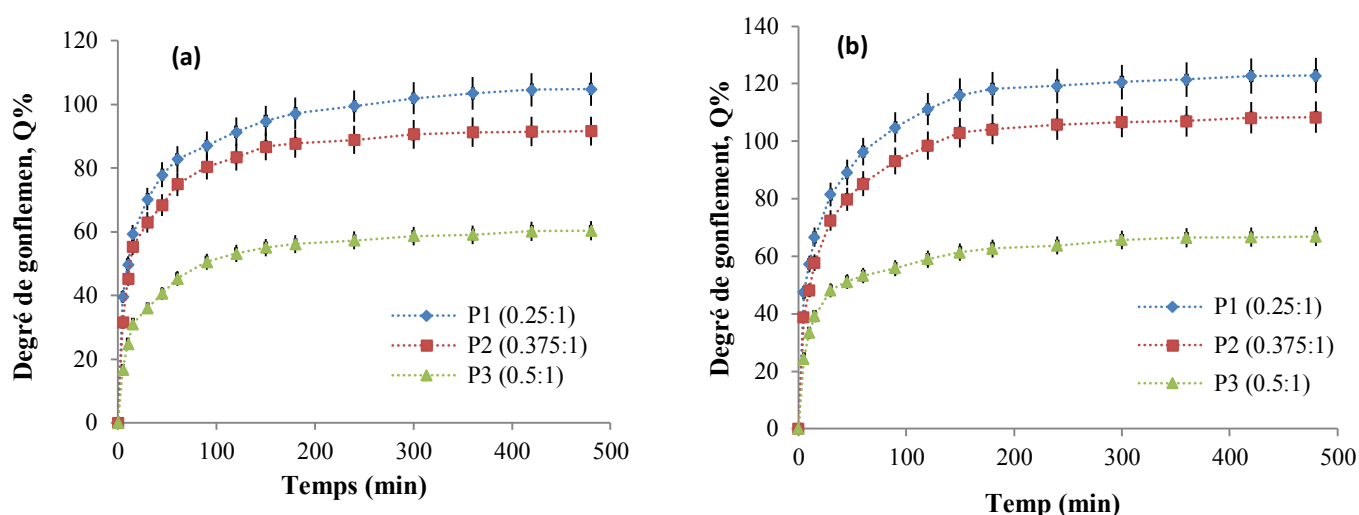


Figure V.24 : La variation avec le temps du degré de gonflement en fonction de différents rapports molaires des hydrogels obtenus P1, P2 et P3 dans deux solutions de pH différents: a) pH = 5,5 et b) pH = 7,4 , (durée de réticulation = 3 h, T_{réaction} = 55°C).

D'après les graphes présentés, nous pouvons observer le fait que le degré de gonflement est plus faible pour les quantités de l'agent de réticulation plus grandes. Dans le cas du film hydrogel qui a été préparé à base de CMCOx dans le rapport molaire (0.5 /1) qui a atteint un taux de gonflement plus bas, quelle que soit la valeur du pH de la solution dans laquelle les films d'hydrogels ont été immergés, un effet absolument cohérent avec le DC_{amine} de l'évolution des groupements amines. Le milieu faiblement alcalin provoque une augmentation du degré de gonflement en raison des groupes carboxylates de la composition CMC. Il convient de noter que les répulsions électrostatiques entre les segments de chaîne du réseau polymère sont intenses et sont influencées par le nombre de groupes carboxylates de CMCOx et déterminent l'absorption d'une quantité plus élevée de la solution tampon.

Les résultats obtenus ont permis d'optimiser la réaction de réticulation entre CS avec CMCOx pour obtenir des films d'hydrogels avec des applications biomédicales. Un film optimal doit être mécaniquement stable et avoir une grande capacité à inclure et à libérer des principes actifs à libération contrôlée. Un degré de réticulation élevé provoque l'incorporation d'une petite quantité de principe actif et une diffusion lente de celui-ci à partir de la matrice polymère en des quantités qui peuvent ne pas atteindre la concentration thérapeutique mais avec une stabilité mécanique élevée. Les paramètres optimaux d'obtention du film doivent être identifiés pour assurer une bonne stabilité mécanique et une forte capacité d'inclusion et de libération contrôlée du principe actif. Compte tenu des résultats présentés ci-dessus, les paramètres optimaux établis pour l'obtention des films utilisés pour les applications de peaux étaient:

- la température de réticulation de 55°C,
- le temps de réticulation est environ 2,5 heures
- le rapport molaire -CHO / NH₂ compris entre (0,25/ 1) et (0,5/ 1).

Nous avons choisi un polyphénol, la curcumine, comme principe actif car il possède des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et antibactériennes utilisées dans de nombreuses applications biomédicales [304]. Dans les paragraphes suivants, nous déterminerons l'efficacité d'encapsulation de la curcumine dans des films d'hydrogels obtenus en utilisant différents rapports molaires entre les groupements amines de CS et les groupes aldéhydes dans CMCOx, l'activité antioxydante de la curcumine encapsulée et la détermination de la perméabilité de la curcumine encapsulée dans la peau de poulet.

En ce qui concerne l'influence de la composition du rapport molaire dans l'obtention des hydrogels sur les caractéristiques de gonflement la conclusion antérieure se confirme dans le sens que le degré de gonflement, sur toute sa durée de l'évolution, diminue avec l'augmentation de la quantité de réticulant.

Il s'agit d'une évolution logique, parce que la densité de réticulation croît avec l'augmentation de la quantité de réticulant.

Le milieu faiblement alcalin assuré par le tampon phosphate ne change pas la disposition des courbes cinétiques, qui montrent aussi une diminution de degré de gonflement avec l'augmentation du taux de réticulant (CMCOx) (fig. V.24 (b)). Une fois de plus on vérifie la conclusion antérieure, respectivement le fait que le milieu faiblement basique facilite un gonflement plus fort (voir l'explication antérieure).

Tous les résultats présentés dans ce chapitre montrent clairement comme on s'attendait, que le comportement de nos hydrogels dans des milieux aqueux est dépendant du pH, et bien sûr des conditions d'obtention des hydrogels. Par le choix judicieux des paramètres d'obtention, on peut obtenir des hydrogels avec des propriétés préétablies, capables d'inclure comme on verra ultérieurement, des quantités variables des médicaments, et destiné à être utilisés dans différentes applications médicales.

V.5. Capacité des hydrogels d'inclure et libérer la curcumine

L'objectif de cette thèse a été l'obtention de nouveaux systèmes à base des polymères naturels destinés à l'inclusion et libération contrôlée/soutenue des composés biologiquement actifs. On a choisi comme produit à activité biologique la curcumine, qui est d'une part un produit naturel, et d'autre part elle possède une activité antioxydante et d'ici antitumorale bien connue. L'inconvénient c'est que la curcumine présente une très faible solubilité dans l'eau, et donc une faible biodisponibilité. On peut améliorer la solubilité par inclusion dans la cyclodextrine par exemple, comme on verra dans le chapitre 6. Mais, pour l'inclure dans les hydrogels, on peut la solubiliser dans des solvants organiques, non toxiques, qui peuvent diffuser dans les hydrogels grâce à leur hydrophilie suffisamment élevée ; un exemple d'un tel solvant est l'alcool éthylique.

Par conséquent, pour inclure la curcumine dans les hydrogels rapportés dans ce chapitre, nous avons choisi de la solubiliser dans l'éthanol, ensuite de suspendre nos hydrogels dans la solution obtenue et finalement d'évaporer l'alcool, ce qui fait que la curcumine reste piégée dans le film.

V.5.1. Capacité des films d'encapsuler la curcumine

Pour déterminer la capacité des films d'inclure la curcumine, on a travaillé selon le protocole présenté en section IV.6.9.1. Les résultats obtenus pour l'efficacité d'encapsulation de la curcumine dans les échantillons analysés sont présentés à la figure V.25.

On a déterminé la quantité de curcumine restée dans le flacon avec la solution alcoolique de curcumine (restée non incluse dans les films) et de la solution de PBS. La quantité de curcumine incluse dans le film a été calculée comme différence entre la quantité solubilisée initialement dans l'alcool éthylique, et celle trouvée dans les deux solutions analysées après l'encapsulation (éthanol, PBS).

L'efficacité de l'encapsulation a été calculée à base de la relation (V.1) suivante :

$$Ef (\%) = \frac{\text{Quantité du curcumine encapsulée dans le film}}{\text{Quantité initiale du curcumine}} * 100 \quad (\text{éq V.1})$$

On a constaté que l'efficacité d'inclusion dépend du taux de réticulation des films, respectivement du rapport entre les groupements fonctionnels : -CH=O/NH₂. Cette dépendance est illustrée dans la figure V.25.

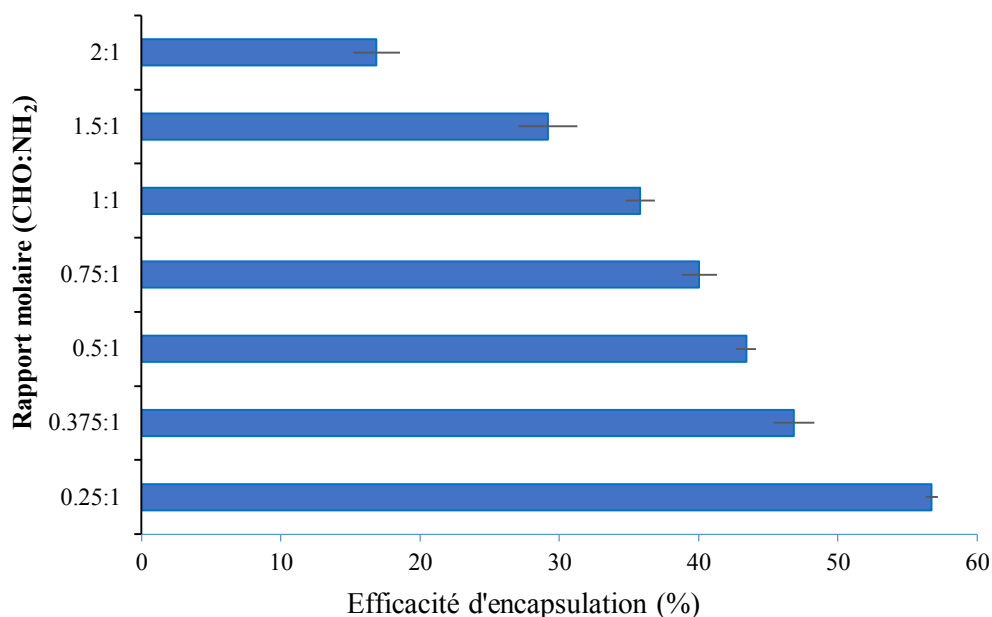


Figure V.25 : Variation de l'efficacité d'inclusion de la curcumine dans les films de CS / CMCOx obtenus en fonction du rapport molaire -CH=O/NH₂ (mol/mol).

Il a été trouvé que l'efficacité d'encapsulation de la curcumine diminue avec l'augmentation du taux de réticulation, respectivement du rapport -CH=O/NH₂, par conséquent, effet normal étant donné que la densité de réticulation augmente. Cet effet a été déterminé par le fait que la taille de mailles du réseau polymère était de plus en plus petite lorsque la densité de réticulation augmentait, et la quantité de curcumine qui pouvait diffuser dans la matrice polymère réticulée était plus faible.

V.5.2. Capacité des films de libérer la curcumine

❖ Analyse de la perméabilité transdermique in vitro par cellules de diffusion verticale de Franz

Les films chargés de la curcumine ont été analysés du point de vue capacité de libérer le principe biologiquement actif. La cinétique de libération de la curcumine à partir des films obtenus a été étudiée sur une cellule de Franz en utilisant la peau de poulet comme membrane

de séparation entre les compartiments de la cellule. La méthode a été décrite dans la section des méthodes de caractérisation. La figure V.26 montre les courbes cinétiques de libération (en termes de perméabilité) de curcumine dans une solution tampon d'acétate 0,1 M à pH = 5,5 contenant 1% de Tween 80 et dans une solution tampon phosphate 0,1 M contenant 1% de Tween 80 à pH = 7,4 pour les trois films P1C, P3C et P5C qui diffèrent par le taux de réticulation. Ces échantillons ont été sélectionnés pour mettre en évidence très clairement l'influence du degré de réticulation, déterminée par le rapport molaire - CHO / NH₂, étant cohérent avec l'indice de conversion des groupements amines, sur le processus de libération de la curcumine à partir des films obtenus. Le tableau V.4 montre l'efficacité de libération et les valeurs de perméabilité de la curcumine immobilisée à travers la membrane dans le compartiment récepteur de la cellule de Franz. Le facteur exponentiel (n) a été calculé à partir de l'équation de Ritger-Peppas [268] et également présenté dans le tableau ci-dessous.

Tableau V.4 : L'efficacité de libération et la perméabilité de la curcumine chargée (encapsulée) dans les films hydrogels à travers la membrane de peau.

Echantillon	Rapport molaire	Efabs % sur la membrane de peau, %		Ef % dans le recepneur, %		Ef totale, %		P (µg/cm ²) dans le recepneur (après 48 h)		P (µg/cm ²) dans la membrane, 48 h		P Totale (µg/cm ²), 48 h		N		R ²	
		pH 5.5	pH 7.4	pH 5.5	pH 7.4	pH 5.5	pH 7.4	pH 5.5	pH 7.4	pH 5.5	pH 7.4	pH 5.5	pH 7.4	pH 5.5	pH 7.4	pH 5.5	pH 7.4
P1C	0.25:1	47	8.6	16.5	18	64	26	41.1	71	117	35.1	158	106	0.63	0.43	0.92	0.97
P3C	0.5:1	31.6	3.6	9.5	12	41	15	33.9	66.3	113	20.4	147	87	0.48	0.53	0.81	0.91
P5C	1:1	23.3	3.2	7.4	11	31	14	28.5	49.5	90	14.9	118	64	0.53	0.31	0.97	0.99

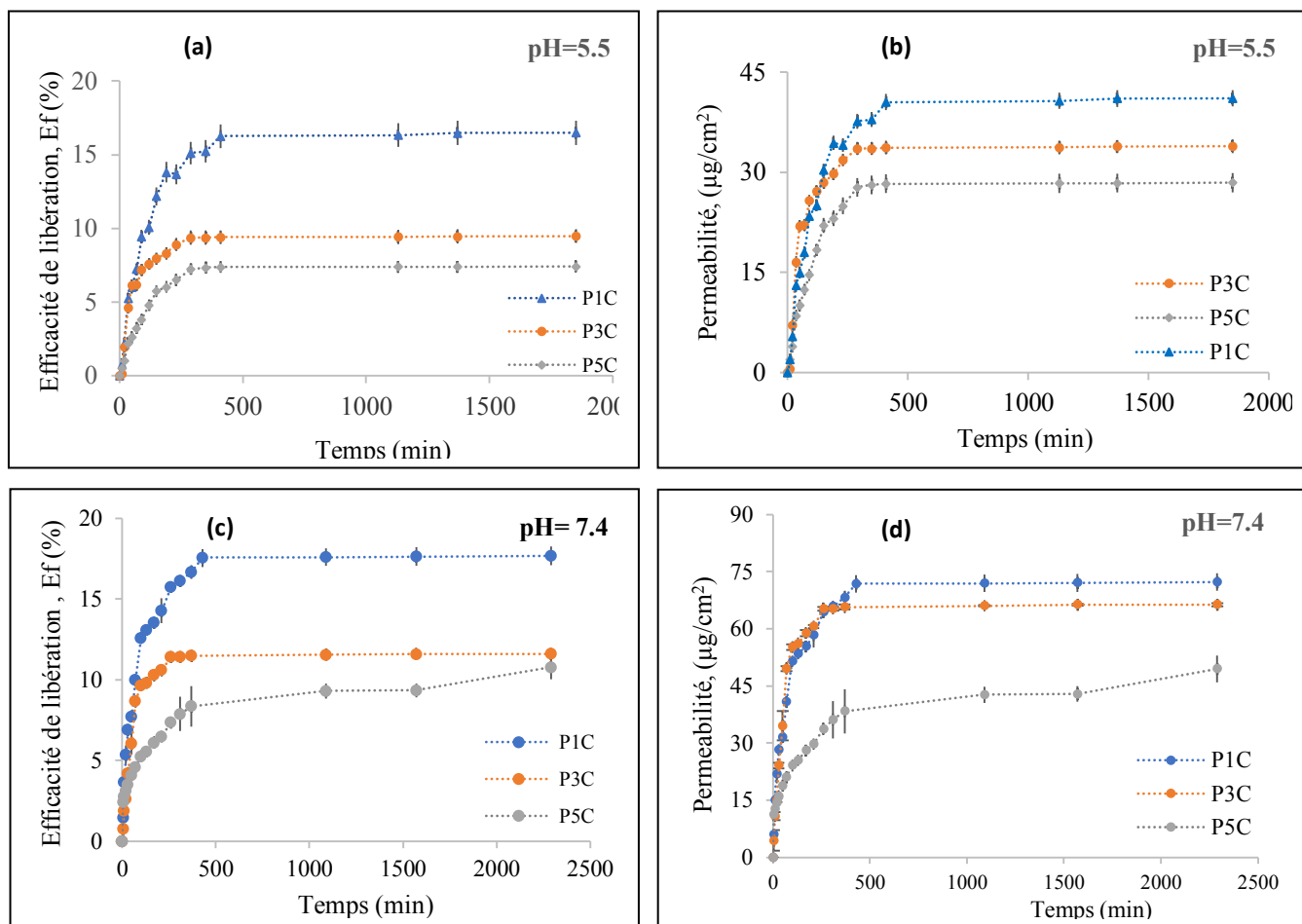


Figure V.26 : Cinétique de libération de la curcumine avec le temps dans une solution ABS à pH = 5,5 exprimée en efficacité de libération (a), ou en termes de perméabilité ($\mu\text{g} / \text{cm}^2$) (b) et dans une solution PBS à pH = 7,4 exprimée en efficacité de libération (c), ou en termes de perméabilité ($\mu\text{g} / \text{cm}^2$) (d), pour les échantillons P1C, P3C et P5C.

L'examen de la figure V.26 (a, c) montre les courbes cinétiques de la libération de curcumine dans le compartiment récepteur après environ 30 heures à pH = 5,5 et après 48 heures à pH = 7,4. Le tableau V.4 montre que l'efficacité de libération totale de curcumine (l'efficacité de libération cumulée de curcumine à partir du compartiment récepteur avec l'efficacité de libération de curcumine calculée sur la base de la quantité de curcumine retenue dans la membrane de peau) était plus élevée à pH = 5,5 que celui à pH = 7,4. L'efficacité de libération totale à pH = 5,5 était de 63,5% comparée à une efficacité de libération de 26% à pH = 7,4 pour les films à faible densité de réticulation (échantillon P1).

L'efficacité de libération augmente lorsque le degré de réticulation est diminué, étant affectée par la taille des mailles du réseau polymère, et c'est plus élevée lorsque le degré de

réticulation était plus faible. La quantité de curcumine retenue dans la membrane de peau (sur la base de laquelle l'efficacité de libération dans la peau a été calculée) était plus faible à pH = 7,4 comparé à celui de pH = 5,5 (tableau V.4). La valeur de pKa pour le CS varie entre 6,17 et 6,51 [305 ,306].

À un pH inférieur à la valeur pKa de CS, les groupements amines libres pourraient être protonés et interagir avec différentes protéines de la peau, ce qui indique l'augmentation de l'efficacité d'absorption de la curcumine. Quel que soit le pH utilisé, l'efficacité de rétention dans la peau de la curcumine libérée des films d'hydrogels augmente lorsque le degré de réticulation diminue. Nous remarquons que l'efficacité de libération de la curcumine dans le compartiment récepteur à pH = 7,4 a une valeur plus élevée par rapport à l'efficacité de libération de la curcumine à pH = 5,5 (figure V.26), mais la rétention de la curcumine libérée par les films d'hydrogels à pH = 7,4 dans la membrane de peau était inférieure à pH = 5,5 (tableau V.4).

Au milieu faiblement alcalin, la curcumine se trouve sous forme phénolate et devient plus soluble; par conséquent, son efficacité de libération dans le compartiment récepteur cellulaire de Franz a été intensifiée et sa rétention dans la peau diminuée.

La curcumine libérée par les films à travers la membrane de peau dans le compartiment récepteur à pH = 7,4 dépend des groupements carboxylates trouvés dans la matrice polymère qui conduisent à une augmentation du degré de gonflement, ce qui intensifie la diffusion du principe actif. A ce pH, les groupements amines libres ne sont pas protonés et le film d'hydrogel dans lequel la curcumine était incluse n'interagit pas avec les protéines de la peau.

Des films chargés de la curcumine ont été utilisés pour étudier la perméabilité transdermique *in vitro* à travers la cellule de diffusion de Franz.

La cinétique de libération de la curcumine a également été évaluée en déterminant la perméabilité de la curcumine libérée à travers la membrane de peau dans le temps, exprimée en (μg de curcumine / cm^2). En ce qui concerne la perméabilité à la curcumine à travers la peau, on constate que les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus lors de la détermination de l'efficacité de libération de la curcumine. Ainsi, la perméabilité maximale (totale) de la curcumine encapsulée (la perméabilité à la curcumine du compartiment récepteur cumulée avec la perméabilité de la curcumine retenue dans la membrane de peau) était plus élevée à pH = 5,5 par rapport à celui de pH = 7,4 (tableau V.4) en raison des

groupements amines protonés qui pourraient interagir avec les protéines présentées dans la membrane de peau et, par conséquent, la rétention de la curcumine libérée des hydrogels dans la peau a été améliorée.

Les courbes de variation de perméabilité avec le temps à travers la membrane de peau dans le compartiment récepteur sont présentées sur la figure V.26 (b, d) pour les échantillons P1C, P3C et P5C et les résultats sont cohérents avec ceux obtenus lorsque l'efficacité de libération a été déterminée. Ainsi, on observe une meilleure perméabilité de la curcumine libérée des hydrogels à travers la peau dans le compartiment récepteur de la cellule de diffusion Franz à pH = 7,4 par rapport à pH = 5,5, cet effet étant déterminé par la solubilité légèrement accrue de la curcumine (qui passe partiellement dans le phénolate) en milieu alcalin à pH = 7,4.

On peut constater aussi que les courbes obtenues ont une apparence typique pour les systèmes polymère / médicament à partir de laquelle le médicament a été libéré de manière contrôlée et soutenue, avec un « burst effet » dans les 300 premières minutes.

L'effet est dû à la libération, pendant cette période, de la curcumine adsorbée en surface des films et encapsulée dans les couches supérieures de ceux-ci. Après cette période, la libération est plus lente, avec une tendance à l'équilibre d'atteindre un plateau vers 2000 min.

La libération, exprimée ici par la variation de la perméabilité par la membrane, dépend du taux de réticulation du film. Elle est de plus en plus lente par l'augmentation de taux de réticulation, effet logique étant donné le fait que la diffusion du principe actif à travers l'hydrogel devient de plus en plus lente par l'augmentation de la densité du réseau.

La valeur exponentielle du facteur n de l'équation de Ritger Peppas a été calculée sur la base des courbes de libération de curcumine. Ces courbes montrent que le mécanisme de diffusion était pratiquement non-Fickien pour la plupart des échantillons utilisés pour étudier la cinétique de libération. Pour la libération de curcumine de l'échantillon P1C, la valeur du facteur exponentiel n était de 0,63; ainsi, le mécanisme de diffusion était de type non fickien et perturbé par certains facteurs dont l'influence n'a pas été étudiée. De plus, à pH = 7,4, la valeur exponentielle du facteur n pour la libération de curcumine à partir de l'échantillon P5C était de 0,31, indiquant un mécanisme de diffusion de type fickien, mais probablement perturbée par des interactions plus fortes entre la curcumine et les constituants polymères des groupes fonctionnels des hydrogels. On peut observer à partir des courbes de perméabilité et d'efficacité que la libération de curcumine pour l'échantillon P5C n'a pas atteint un équilibre après 48 heures. Il est possible que ces interactions entre la curcumine et la matrice polymère déterminent la perturbation de la diffusion du principe actif.

Agrawal et coll. ont démontré que la perméabilité à la curcumine dans un hydrogel à base de Carbopol 940F à travers la peau de souris était de $0,67 \pm 0,01 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ par heure, et la perméabilité à la curcumine libre dans les solutions aqueuses est de $0,46 \pm 0,02 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ par heure [307]. Ternullo et coll. ont également obtenu une perméabilité à la curcumine de $1,5 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ par heure sur la peau humaine à partir d'un hydrogel de CS avec la curcumine immobilisée [308]. Dans notre cas, la perméabilité totale de la curcumine après sa diffusion du film dans la peau de poulet à pH = 5,5 était comprise entre $2,27 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ par heure et $3,3 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ par h, et à pH = 7,4, elle était comprise entre $1,33 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ et $2,21 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ par heure. Les propriétés bioadhésives du CS pourraient déterminer cette perméabilité améliorée à la curcumine des films obtenus à travers la peau du poulet, et la CMCOx contribue à l'augmentation du caractère hydrophile du film en raison des groupements carboxyliques libres qui pourraient interagir à pH = 5,5 avec des protéines de peau contenant des résidus de lysine.

V.6. Analyse de l'activité antioxydante de la curcumine immobilisée

La curcumine est un produit bien connu pour son activité antioxydante, qui est due à la présence des groupements de type phénol dans sa structure. C'est la raison pour laquelle, parmi d'autre, la curcumine a une activité antitumorale. On s'est proposé d'établir si cette activité se modifie par l'immobilisation dans nos films hydrogels. Il y'a plusieurs méthodes pour déterminer l'activité antioxydante de polyphénols, ça veut dire la capacité de ces composés de piéger les radicaux libres, responsables de l'évolution du cancer.

La méthode la plus courante pour l'évaluation du piégeage des radicaux libres issus des polyphénols est l'utilisation du DPPH [309, 310]. Cette méthode est basée sur la capacité de DPPH, un radical libre stable, d'être capté par les antioxydants, effet qui peut être mis en évidence par un changement de la couleur des solutions des DPPH en présence d'un antioxydant, et qui peut être quantifié par spectroscopie UV-Vis (une réduction des valeurs des absorbances à une longueur d'onde spécifique. Dans le test au DPPH, l'antioxydant stabilise donc le radical DPPH. La réaction par laquelle les antioxydants peuvent capter le radical libre du DPPH est la suivante :

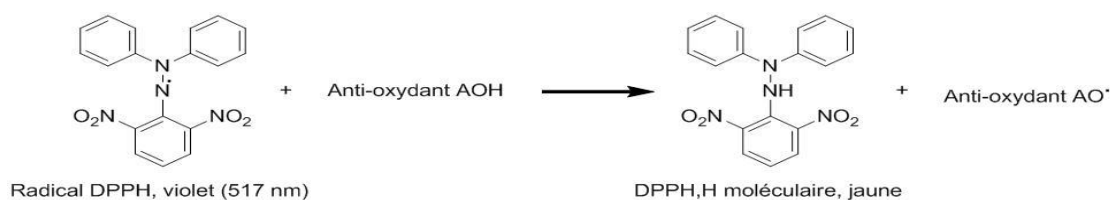


Figure V.27 : Réaction de réduction du radical libre DPPH•

Il est bien établi que le piégeage des radicaux DPPH par les antioxydants dépend de la capacité de ces derniers à donner de l'hydrogène. L'activité antioxydante est évaluée par l'intermédiaire du IC₅₀, qui exprime la valeur de la concentration du AH pour laquelle la concentration des radicaux de DPPH diminue à moitié de la valeur initiale. Plus la valeur d'IC₅₀ est faible, plus l'activité antioxydante est puissante. On a déterminé la valeur d'IC₅₀ pour les films P1C, P3C et P5C, pour CS et CMCOx, pour le film P5 sans curcumine immobilisée, pour la curcumine libre, ainsi que pour trois mélanges obtenus en utilisant les mêmes quantités de CMCOx et de curcumine que dans échantillons P1C, P3C et P5C. L'acide ascorbique a été utilisé comme composé de référence (standard).

Les mélanges de curcumine avec la CMC ont été dissous dans 50 ml de solution éthanol /eau distillée, et ont été codés avec M1, M3 et M5, et différentes solutions de concentration de curcumine exprimées en $\mu\text{moles/ml}$ ont été utilisées pour déterminer le pourcentage d'inhibition des radicaux libres de DPPH. Sur la base de ces résultats on peut évaluer l'activité antioxydante exprimée par IC₅₀ pour les mélanges mentionnés précédemment. L'évaluation de l'activité antioxydante de la curcumine immobilisée au sein des films d'hydrogels permet d'étudier l'influence des constituants polymères et le rapport molaire entre les polymères sur cette caractéristique de principe actif. En principe, lorsque la valeur IC₅₀ est inférieure, l'activité antioxydante est plus élevée. Comme mentionné dans la section IV.6.15, la valeur d'IC₅₀ a été déterminée sur la base de la représentation graphique entre le pourcentage d'inhibition par rapport à la concentration exprimée en ($\mu\text{mol / ml}$). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau V.5 et la figure V.28.

Tableau V.5 : L'activité antioxydante exprimée par IC₅₀ pour les échantillons analysés.

Echantillons	IC ₅₀ , (μmoles)
Acide ascorbique	0.031 \pm 0.00053
Curcumine	0.051 \pm 0.00033
P1C	0.054 \pm 0.00039
P3C	0.046 \pm 0.00039
P5C	0.039 \pm 0.00012
M1	0.082 \pm 0.0032
M3	0.081 \pm 0.00041
M5	0.092 \pm 0.00846
P5+M5	0.035 \pm 0.00012
CS	0.4 \pm 0.0103
P5 (sans curcumine)	10.02 \pm 0.28

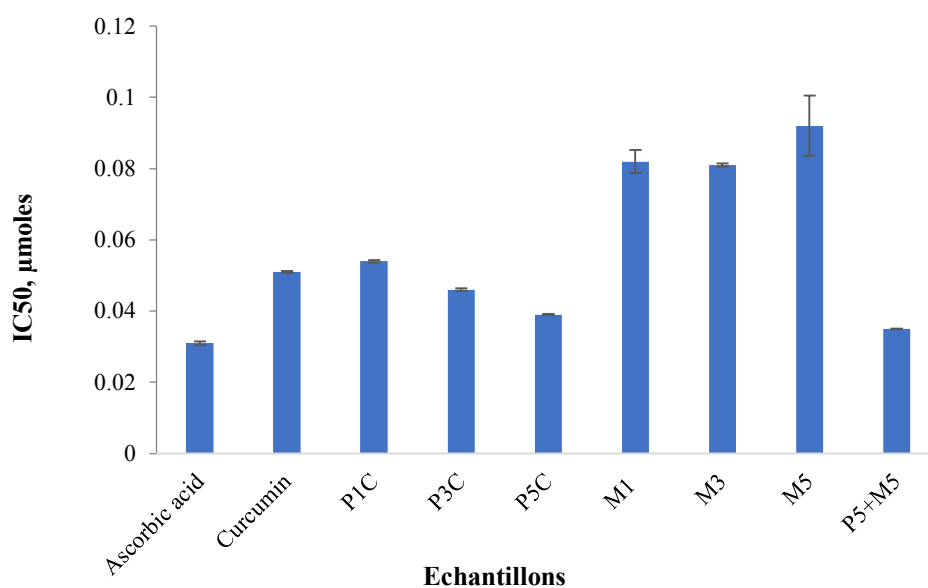


Figure V.28 : Les valeurs obtenues d'IC50 pour les échantillons analysés.

Il a été trouvé que les valeurs d'IC50 pour la curcumine libre et la curcumine incluse dans le film P1C sont proches, mais la valeur d'IC50 est diminuée lorsque la quantité de CMCOx dans les films augmente. L'activité antioxydante du film d'hydrogel chargé de la curcumine augmente à mesure que le degré de réticulation du film d'hydrogel aussi augmente. Afin de déterminer si le CS ou CMCOx influence l'activité antioxydante de la curcumine, la valeur d'IC50 a été déterminée pour l'échantillon de CMCOx, CS et du film P5 sans curcumine et pour les mélanges (curcumine /CMCO) ont été codés avec M1, M3 et M5. L'influence du film d'hydrogel P5 sur l'activité antioxydante a été évaluée et a été utilisée avec les mêmes quantités de film pour déterminer le pourcentage d'inhibition des radicaux libres DPPH que dans le cas de la détermination du pourcentage d'inhibition du film P5C chargé de la curcumine.

Comme a été mentionné précédemment, l'efficacité d'encapsulation de la curcumine dans les films est diminuée avec l'augmentation du degré de réticulation. Par conséquent, pour obtenir la même concentration de curcumine dans la solution d'éthanol utilisée pour déterminer le pourcentage d'inhibition des radicaux libres DPPH pour les films d'hydrogel P1C, P3C et P5C, la quantité de film utilisée pour cette détermination était plus élevée à mesure que le degré de réticulation des films était amélioré.

Les résultats obtenus ont montré que la CMCOx n'avait pas une activité antioxydante, par contre, le CS avait une activité antioxydante, et sa valeur d'IC était bien supérieure à celle de la curcumine.

On a également aussi constaté que la valeur d'IC₅₀ était significativement plus élevée pour le film P5 par rapport à celle obtenue pour le CS. Cependant, la concentration utilisée dans le film de CS pour déterminer le pourcentage d'inhibition était supérieure à la concentration utilisée de CS libre. Il est possible que l'activité antioxydante de CS diminue car les groupements amines libres sont de moins en moins nombreux lorsqu'ils réagissent avec les groupes aldéhyde de la CMCOx. Le DC_{amine} de groupements amines dans les bases de Schiff pour les films hydrogels avec un rapport molaire de (1/1) était de 76,5%, ce qui signifie que seulement 23,5% du total des groupements amines sont libres.

La valeur d'IC₅₀ pour la curcumine dans les mélanges M1 et M3 était proche, mais cette valeur a été augmentée pour l'échantillon M5 par rapport aux deux autres échantillons. L'activité antioxydante des échantillons M1, M3 et M5 était supérieure à celle de la curcumine libre. On remarque que l'activité antioxydante est diminuée avec l'augmentation de la quantité de CMCOx ajoutée dans le mélange (curcumine / CMCO).

La curcumine libre peut interagir avec les groupes aldéhydes de la CMCOx, et de nouveaux composés peuvent être formés. Les spectres UV-vis enregistrés montrent deux pics à des longueurs d'onde de $\lambda = 292$ nm et $\lambda = 360$ nm, qui ne sont pas caractéristiques de la curcumine (425 nm). Dans une autre étude, au future, nous essaierons d'élucider cet aspect. Pour le film P5C, la valeur d'IC₅₀ atteindre 0,039 μ mol et l'activité antioxydante était supérieure à celle de la curcumine libre. Cependant, la valeur d'IC₅₀ augmente, étant de 0,092 μ moles pour le mélange M5, dans lequel les mêmes quantités de curcumine et de CMCOx ont été utilisées que dans le film d'hydrogel P5C.

Afin de déterminer si la valeur IC₅₀ obtenue de 0,039 μ mol peut être influencée par l'activité antioxydante du CS, les pourcentages d'inhibitions obtenus à partir de l'analyse de chaque quantité de film P5 sans curcumine ont été additionnés avec le pourcentage d'inhibition obtenu pour chaque concentration de curcumine du mélange M5.

Ensuite, sur la base de la courbe obtenue à partir du graphe I% par rapport à la concentration de curcumine (μ moles / ml), IC₅₀ a été déterminée. La valeur d'IC₅₀ obtenue était de 0,035 μ M, ce qui est très proche de la valeur d'IC obtenue à partir de la curcumine chargée dans le film P5C, ce qui explique l'augmentation de l'activité antioxydante des films chargés en curcumine.

Les résultats obtenus ont montré que le CS influence sur les valeurs d'IC50 de curcumine et identifie les films chargés de curcumine avec activité antioxydante améliorée. Les films obtenus à base de CS ont été réticulés avec des groupes aldéhydes de CMCOx, puis séchés avant l'encapsulation de la curcumine, et la possibilité d'interaction entre la curcumine et la CMCOx était très faible. Ainsi, la longueur d'onde à laquelle la curcumine incluse dans le film avait une absorption maximale ne change pas par rapport à la longueur d'onde caractéristique de la curcumine libre (425 nm). Donc, les films de CS influencent sur l'activité antioxydante de la curcumine et de la valeur d'IC50 diminue.

Les résultats obtenus ont permis d'optimiser la réaction de réticulation entre le CS avec la CMCOx pour obtenir des films d'hydrogels avec des applications biomédicales. Un film optimal doit être flexible, mécaniquement stable et avoir une grande capacité à inclure et à libérer de principes actifs à libération contrôlée. Un degré de réticulation élevé provoque l'incorporation d'une petite quantité de principe actif et une lente diffusion de celui-ci à partir de la matrice polymère dans des quantités qui peuvent ne pas atteindre la concentration thérapeutique, mais avec une stabilité mécanique élevée. Les paramètres optimaux d'obtention du film doivent être identifiés pour assurer une bonne stabilité mécanique et une forte capacité d'inclusion et de libération contrôlée du principe actif. Compte tenu des résultats présentés ci-dessus, les paramètres optimaux établis pour l'obtention des films utilisés pour les applications transdermiques étaient: la température de réticulation de 55 ° C, le temps de réticulation de 2,5 heures et le rapport molaire -CHO / NH₂ compris entre 0,25/1 et 0,5/1. Enfin, on peut dire que 0,375/1 est le rapport préférable.

V.6. Conclusions

L'utilisation de la carboxyméthylcellulose oxydée comme réticulant constitue une méthode prometteuse pour l'obtention des hydrogels sans aucune toxicité, donc biocompatibles et potentiellement utilisables comme supports pour l'inclusion et la libération de médicaments.

Le test ninhydrine nous a confirmé que le nombre des liaisons formées par la consommation des groupements amines libres aux films de CS/CMCOx augmente avec le taux de réticulant (CMCOx) et détermine une variation proportionnelle de la densité de réticulation et inversement proportionnelle du degré de gonflement.

La capacité de gonflement des hydrogels en milieu aqueux dépend donc de la composition des hydrogels, et donc du taux de gonflement.

Les hydrogels présentent une capacité satisfaisante d'encapsuler la curcumine.

Les systèmes obtenus libèrent le produit biologiquement actif, mais l'efficacité du processus n'est pas très élevée, et s'explique par le fait que la curcumine est un composé hydrophobe et donc peu soluble dans la solution aqueuse de buffer. Le processus de libération diminue en intensité par l'augmentation du taux de réticulation (donc du rapport $-CH=O/NH_2$), l'effet est due à la diffusion de plus en plus lente du produit biologique dont la molécule est volumineuse, par le réseau de plus en plus dense.

Chapitre VI

VI.1. Introduction

L'objectif de cette partie de recherche porte sur l'obtention d'un autre type d'hydrogels à base de chitosane, réticulés par voie chimique, afin de les utiliser comme matrices pour l'inclusion et la libération de principes actifs libres (curcumine). Ils permettront d'établir la capacité de ces films de libérer d'une manière contrôlée le médicament afin de valider l'hypothèse de laquelle nous sommes partis pour aborder cette thèse. La recherche effectuée est parti des résultats préliminaires obtenus dans le cadre de recherches antérieures rapportés dans la littérature [311,312]. Des hydrogels sous forme de films ont été synthétisés, caractérisés puis utilisés pour immobiliser le médicament. Cette fois, les hydrogels ont comme composants le chitosane (CS), la carboxyméthylcellulose oxydée (CMCOx) et comme partenaire la protéine de lactalbumine (LA) ; le CS et LA sont co-réticulés avec la carboxyméthylcellulose oxydée (CMCOx). Le produit biologiquement actif utilisé pour encapsulation est la curcumine, et antérieurement on a justifié ce choix. Dans le chapitre antérieur on a vu que, à cause de la très faible solubilité de la curcumine dans l'eau, on a décidé de la solubiliser dans l'alcool éthylique, qui grâce à son caractère polaire (mais bien sûr plus faible que l'eau) peut gonfler les hydrogels et pénétrer dans leur intimité. Évidemment, la curcumine va diffuser aussi à l'intérieur de l'hydrogel ou elle va rester piégée (encapsulée) suite à l'élimination de l'alcool par évaporation.

Cette fois, pour augmenter la solubilité de la curcumine et pour la rendre soluble même dans l'eau, ce qui aura pour effet l'augmentation de sa biodisponibilité, on a choisi de réaliser tout d'abord un complexe à base de curcumine par son inclusion dans la cavité hydrophobe de la β -cyclodextrine. Ce complexe, qui est beaucoup plus hydrosoluble, a été encapsulé ultérieurement dans les hydrogels au moment de leurs obtentions.

En ce qui suit, on va présenter les résultats obtenus pour ces hydrogels chargés du complexe de la curcumine, par comparaison aux hydrogels non-chargés.

Ayant en vue la présence dans le chitosane et lactalbumine des groupes amines, ainsi que le fait que la réaction de réticulation se développe dans un milieu acide, la CMCOx utilisée comme réticulant va réagir par l'intermédiaire de ses groupements aldéhydes en formant des ponts de type base Schiff entre les chaînes des polymères, et finalement on obtient des hydrogels de type réseau interpénétré/interconnecté.

Dans ce chapitre nous montrerons les résultats de ces systèmes polymères, en ce qui concerne d'une part les propriétés d'hydrogel, essentielles pour l'inclusion et la libération des principes actifs hydrosolubles en solution buffer (*in vitro*) et par la peau (*ex vivo*), et d'autre

part la modélisation de la cinétique de libération de la curcumine incluse dans les matrices polymériques dans ces hydrogels.

VI.2. Obtention des hydrogels sous forme de films à base de chitosane et de lactalbumine réticulés avec la CMCOx, sans et avec le complexe d'inclusion de la curcumine

Les hydrogels contenant de lactalbumine associée au chitosane, réticulés avec la CMCOx ont été obtenus par le même protocole décrit dans la section du chapitre IV.5.1.3 , en notant que le lactalbumine a été solubilisé et ajouté en quantités égales (50 mg) à chaque mélange de chitosane et CMCOx.

Une première série des films a été obtenue en absence du complexe d'inclusion de la curcumine dans la β -cyclodextrine.

L'inclusion de la curcumine dans β -cyclodextrine se fait par la réaction suivante :

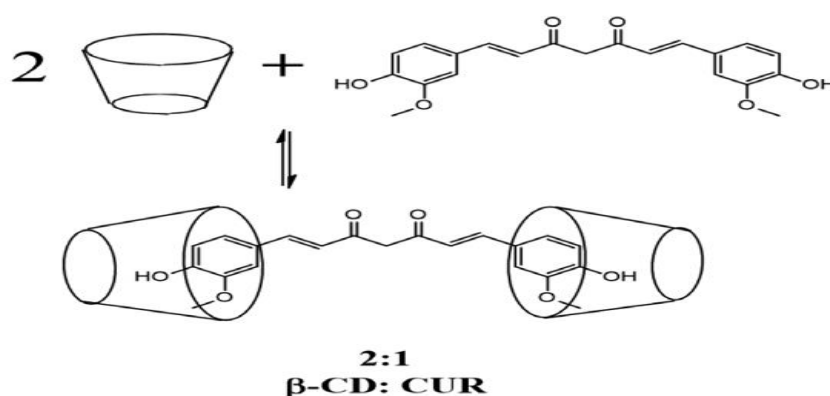


Figure IV.1 : Structure du complexe d'inclusion de (β -CD) et curcumine d'un rapport (2:1) [313].

Une deuxième série des films ont été obtenus par l'introduction du complexe d'inclusion (180 mg) dans le mélange de chitosane et lactalbumine, suivie par la réticulation avec la CMCOx. Le protocole expérimental suivi pour obtenir les hydrogels est donné dans le tableau VI.1.

Le seul paramètre d'influence a été le rapport molaire entre les groupements aldéhyde (de CMCOx) et amine (de mélange de chitosane et lactalbumine). Les propriétés des films étudiés en fonction de ce paramètre ont été les mêmes que dans le chapitre 5.

Tableau VI.1: Plan expérimental utilisé pour l'obtention des films à base de CS/LA réticulés avec CMCOx, avec le complexe curcumine/ β -cyclodextrine immobilisé.

Echantillon	Rapport molaire (-CH=O/-NH ₂)	Quantité du chitosane (-NH ₂) (molesx10 ³)	Quantité du lactalbumine (LA) (molesx10 ³)	Quantité CMCOx (-CH=O) (molesx10 ³)	Complexe curcumine/ β -cyclodextrine (mg)
P1 (C)	(0.25/1)	1.75	3.52	0.4375	180
P2 (C)	(0.375/1)			0.656	
P3 (C)	(0.5/1)			0.875	
P4 (C)	(0.75/1)			1.3125	
P5 (C)	(1/1)			1.75	

VI.3. Analyse des groupements amines libres de lactalbumine

L' α -lactalbumine est une protéine dérivée du lait ayant des effets thérapeutiques tels que l'activité antitumorale chez l'homme, l'augmentation de la capacité de réponse immunitaire et du taux de glutathion systémique,... etc. L'utilisation de α -lactalbumine comme partenaire du chitosane a eu pour but deux effets : d'une part pour la solubilisation du complexe d'inclusion (curcumine / β -cyclodextrine) pour faciliter son inclusion dans les hydrogels, et d'autre part, l'obtention d'un réseau interpénétré complexe avec l'hydrophilie ajustable en fonction du taux de lactalbumine, qui est plus hydrophobe par rapport à chitosane.

Pour analyser le taux des groupements amine libre de l'albumine de départ, mais aussi de films après réticulation, on a construit tout d'abord une courbe de calibration en utilisant le même test avec la ninhydrine.

0.05 g de lactalbumine a été dissous dans 5 mL de solution de pH= 2.9 sous une agitation magnétique. De cette solution de départ ont été obtenus par plusieurs dilutions d'autres solutions, qui ont été soumises à l'analyse spectrophotométrique UV-Vis. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 570 nm. La courbe d'étalonnage est représentée dans la figure VI.2.

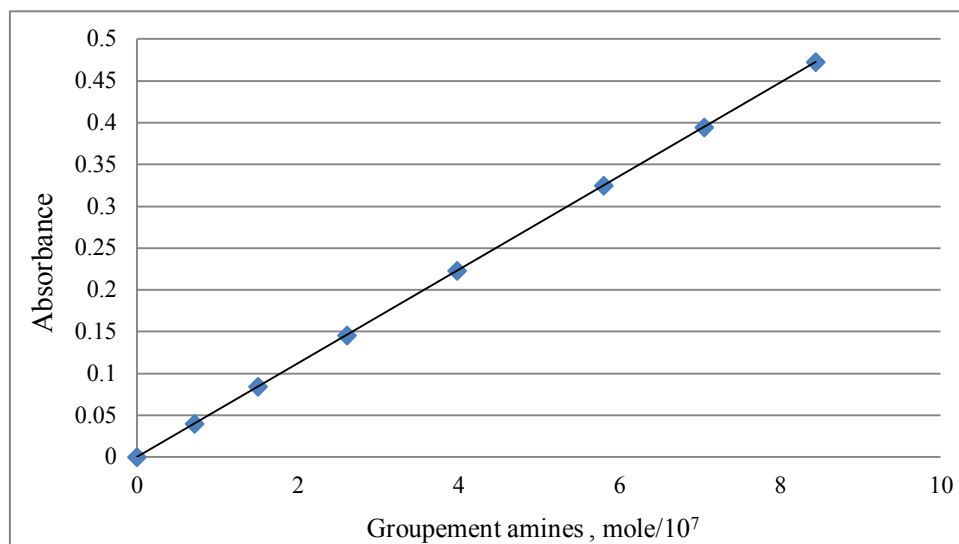


Figure VI.2 : Courbe d'étalonnage de la lactalbumine par la méthode de ninhydrine.

VI.4 Capacité des films hydrogels d'inclure le complexe curcumine/ β -cyclodextrine

Le mode de travail pour l'obtention des hydrogels chargés du complexe d'inclusion a été présenté dans la section IV.5.1.4.

Pour évaluer le taux du complexe inclus et aussi pour étudier la cinétique de libération de la curcumine des hydrogels obtenus, on a construit une courbe d'étalonnage (figure VI.3), en mesurant l'absorbance des solutions de différentes concentrations de la curcumine dans l'éthanol, par spectroscopie UV, en utilisant un nanodrop1000 UV à une longueur d'onde de 425 nm.

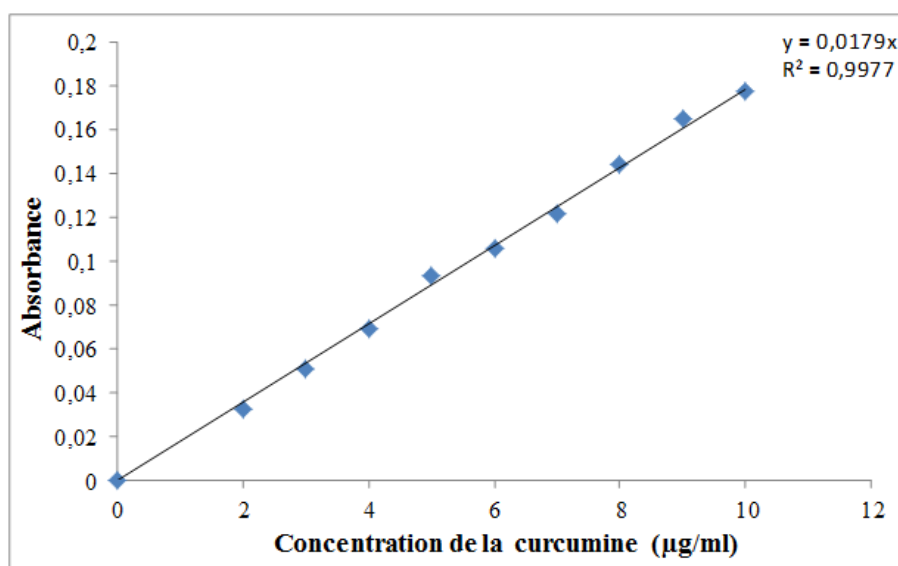


Figure VI.3 : Courbe d'étalonnage de la curcumine dans des solutions en éthanol à 425 nm.

On peut voir que les hydrogels présentent une capacité importante de chargement du complexe curcumine/ β -cyclodextrine comme a été observée dans la figure VI.4.

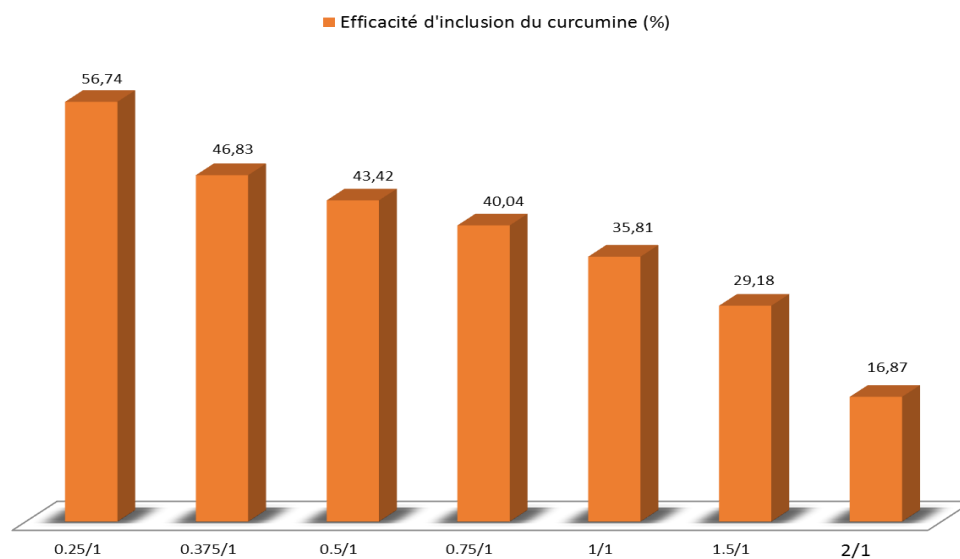


Figure VI.4 : L'efficacité de chargement (inclusion) de la curcumine dans les hydrogels à base de CS/LA/CMCOx, pour différents rapports molaires $-\text{CH}=\text{O}/\text{NH}_2$ ($t_{\text{reaction}} = 2.5 \text{ h}$; $T_{\text{reaction}} = 30 \text{ }^\circ\text{C}$).

La figure VI.4 indique l'efficacité de l'inclusion de la curcumine sous forme de complexe dans les hydrogels analysés, en fonction des rapports molaires. Nous constatons que la quantité de la curcumine incluse dans les hydrogels diminue avec l'augmentation du taux de réticulation, et elle est en corrélation avec le degré de gonflement.

VI.5. Analyse du taux de réticulation des films à base de CS/LA/CMCOx non-chargés avec le complexe d'inclusion curcumine/ β -cyclodextrine

Dans le but de déterminer le taux de réticulation des hydrogels à base de CS/LA/CMCOx, exprimé par le degré de conversion des groupements amines (DC_{amine} , %), nous avons élaboré une série des films à différents rapports molaires entre les groupements $-\text{CH}=\text{O}$ du CMCOx, et groupements amines provenant du chitosane et lactalbumine. L'obtention des hydrogels est basée, comme on a déjà précisé antérieurement, sur la réaction entre les groupements carbonyles (les aldéhydes de CMCOx) et les groupements amines libres de chitosane et de lactalbumine ; évidemment, par cette réaction on réalise des liaisons de type $-\text{CH}=\text{N}-$ (base Schiff), qui vont assurer les ponts de réticulation entre les chaînes de même type (chitosane soit lactalbumine), mais aussi entre les chaînes différentes des polymères, en formant le réseau interpénétré.

L'estimation du taux de réticulation est exprimée d'une manière indirecte par le nombre des groupements amines du chitosane et de lactalbumine (dosés par la méthode de ninhydrine (DC_{amine} , %) qui ont réagis avec la CMCOx comme représenté dans la figure VI.5.

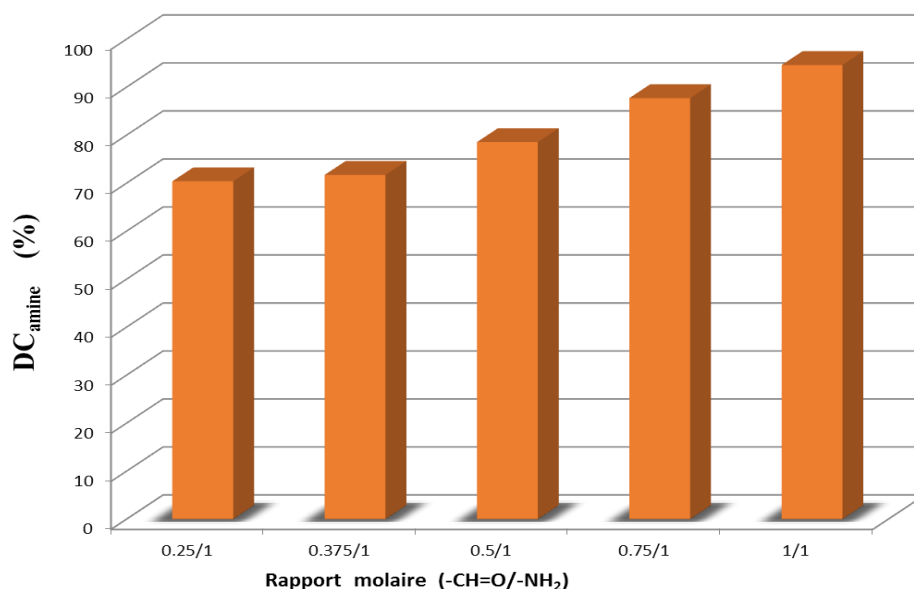


Figure VI.5 : Variation du DC_{amine} (%) des hydrogels à base de CS et LA réticulé avec la CMCOx en fonction de différents rapports molaires – CH=O/ -NH₂, ($T_{\text{reaction}}= 30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

La figure VI.5 indique les valeurs de degré de conversion DC_{amine} (%) des échantillons analysés en fonction de la quantité, pratiquement, de carboxyméthylcellulose oxydé ajoutée. Le taux de réticulation augmente, logiquement, avec l'augmentation du taux de CMCOx ; pour le film qui a été préparé à un rapport molaire (1/1) le degré de conversion DC_{amine} atteint la valeur maximale d'environ 94,61%.

On peut dire, également, que la densité de réticulation de l'hydrogel CS/LA/CMCOx est supérieure dans tous les échantillons analysés par rapport aux hydrogels à base que de CS/CMCOx (voir le chapitre 5). L'analyse par le test de ninhydrine nous a permis de confirmer l'effet positif de l'ajout du lactalbumine sur l'augmentation de la densité de réticulation. Cette analyse est en bonne concordance, comme on verra toute de suite, avec les observations en ce qui concerne le degré maximal de gonflement caractéristique pour ces hydrogels.

VI.6. Analyse du taux de réticulation des films à base de chitosane, lactalbumine et CMCOx qui contiennent le complexe d'inclusion curcumine/ β -cyclodextrine

Pour voir si la présence du complexe dans la composition des films à base de trois polymères peut influencer la réaction de réticulation et le taux de réticulation atteint, on a obtenu une série de films à base de tous les quatre composants.

L'agent de réticulation CMCOx et le polymère de CS ont été mélangés dans divers rapports molaires en tenant compte du fait que la lactalbumine participe à la réticulation.

Des échantillons témoins d'hydrogels ont été préparés en suivant le même protocole précédent dans lesquels le complexe curcumine/ β -cyclodextrine (CUR/ β -CD) a été dispersé. Afin d'estimer le taux de réticulation, nous avons analysé les hydrogels chargés du complexe de la curcumine par la technique de test ninhydrine, puis nous avons calculé le degré de conversion des groupements amines, DC_{amine} %.

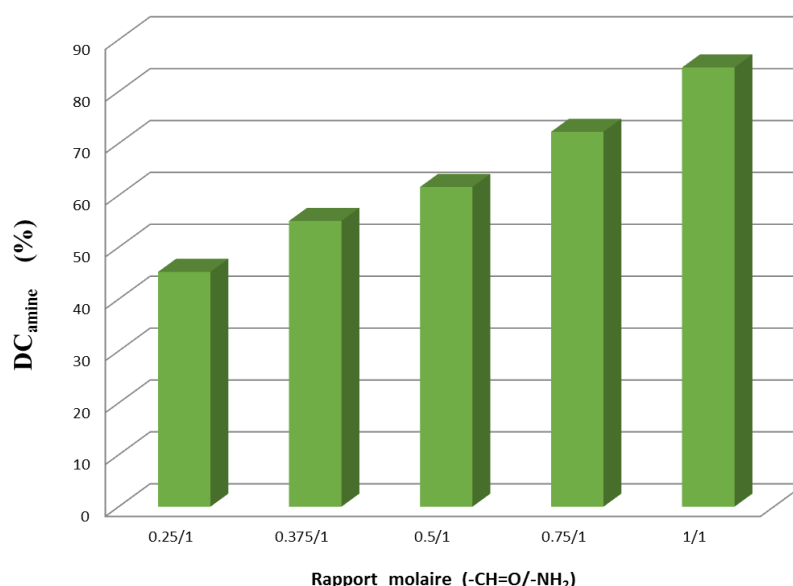


Figure VI.6: Degré de conversion DC_{amine} (%) des hydrogels à base de CS et LA réticulés avec la CMCOx, chargé du complexe de la curcumine avec le β -cyclodextrine en fonction de différents rapports molaires – $CH=O/ -NH_2$, ($T_{reaction} = 30$ °C).

L'examen de la figure VI.6 montre que le taux de réticulation des hydrogels examinés croît aussi et dépend de la quantité d'agent réticulant (CMCOx) utilisé, effet tout à fait attendu. Nous observons que le taux de réticulation des hydrogels de CS/LA/CMCOx chargé du complexe de la curcumine est moins élevé par rapport à ceux sans rajout du complexe (voir fig. VI.5). Cet effet est normal, parce que le volume moléculaire élevé du complexe a pour effet l'augmentation de la distance entre les chaînes des polymères, et

empêche dans une certaine mesure que la réaction de réticulation se produise. Les tests de ninhydrine confirment l'hypothèse de l'impact de l'inclusion du complexe de la curcumine dans les hydrogels sur la capacité de réticulation.

VI.7. Etude du degré de gonflement dans les solutions tampons des hydrogels à base de CS et LA réticulés avec la CMCOx

Les hydrogels à base de CS/LA/CMCOx ont été caractérisés par leurs capacités de gonflement dans deux solutions tampons (pH=7.4 et pH=5.5), étant donné que cette caractéristique influence significativement le processus de libération par diffusion des médicaments inclus. On a étudié la cinétique du processus de gonflement pour un intervalle de temps jusqu'à 8 heures, et on a déterminé le degré maximal de gonflement à cette durée. On a constaté que le processus de gonflement est dépendant du taux d'agent de réticulation covalente (CMCOx), mais aussi, comme on verra ultérieurement, de la présence du complexe d'inclusion dans la composition des films.

Les films obtenus à base de CS/LA/CMCOx non-chargés du complexe ont présenté une transparence et une bonne homogénéité comme observées dans la figure VI.7.

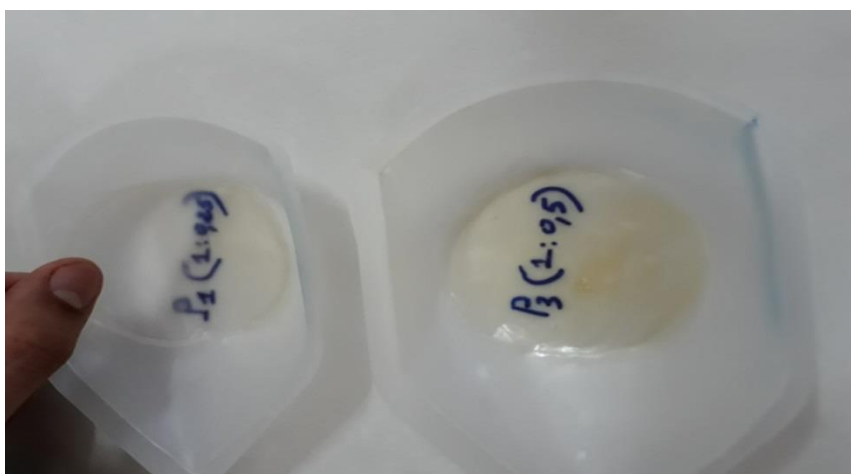


Figure VI.7 : Aspect des films à base de CS et LA réticulés avec CMCOx. Le film P3 (partie droite) et le film P1 (partie gauche).

Les hydrogels ont été pesés et immergés dans une solution tampon phosphate pH = 7,4 (PBS) respectivement dans une solution tampon acétate pH = 5,5 (ABS). Le degré de gonflement a été déterminé à des intervalles de temps bien établis. La cinétique de gonflement des hydrogels est représentée dans la figure VI.8.

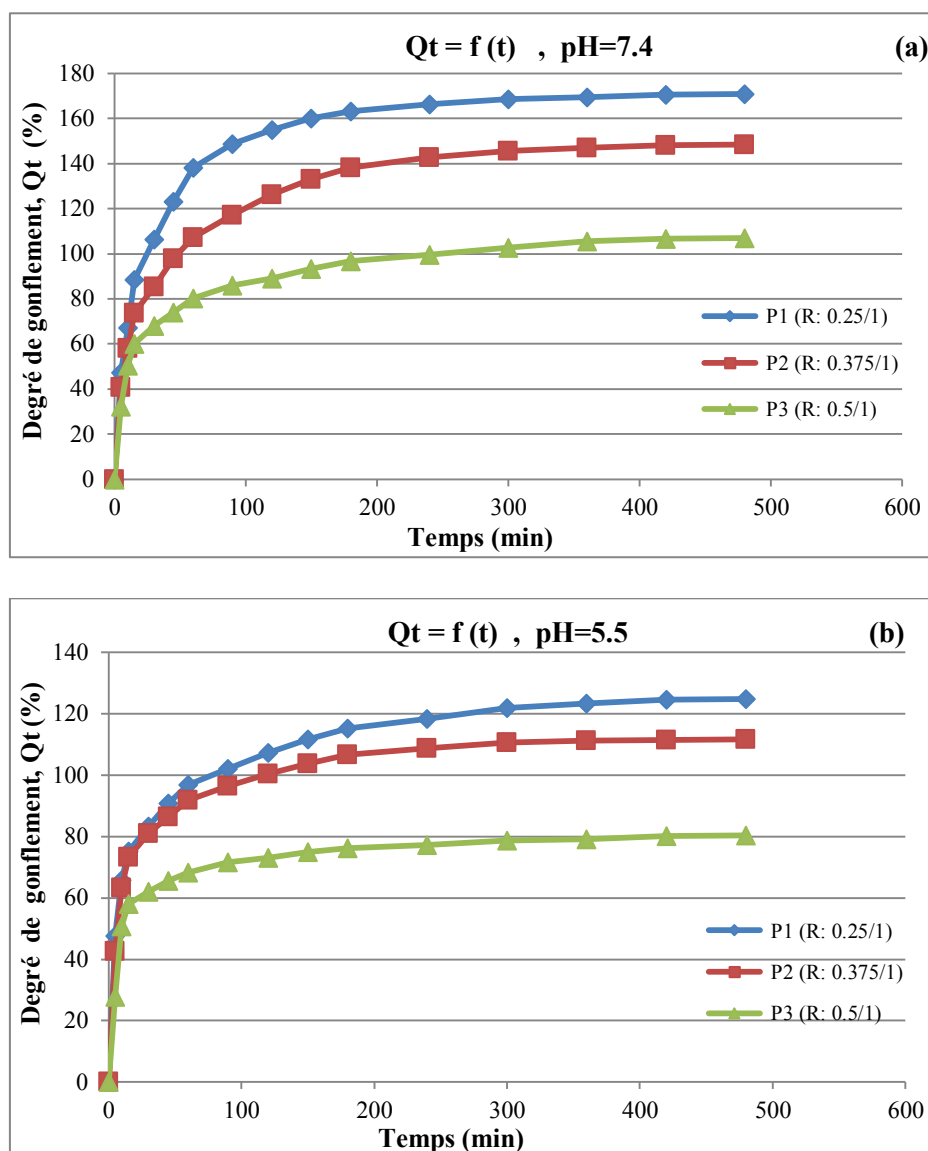


Figure VI.8: Variation du degré de gonflement en fonction du temps pour les échantillons P1, P2 et P3 à base de CS/LA/CMCOx (temps de réticulation de 3h , $T_{\text{reaction}}= 30^{\circ}\text{C}$) dans: (a) tampon phosphate à pH = 7,4; (b) tampon acétate à pH = 5,5.

Le degré de gonflement maximal des hydrogels varie dans l'intervalle de 70 à 170 % en notant qu'il est fortement influencé par le degré de réticulation, et par le pH du milieu. De la figure VI.8. on voit que le degré maximal de gonflement des hydrogels diminue avec l'augmentation du degré de réticulation, donc avec la quantité de CMCOx utilisée comme réticulant, indifféremment de la valeur du pH, effet tout à fait attendu, parce que la densité de réticulation des hydrogels augmente avec le taux de réticulant.

Le taux de gonflement de l'hydrogel P1 dans la PBS à pH = 7,4, indique une valeur plus élevée, autour de 170%, bien supérieure au film P3 le plus réticulé, dont la valeur est plus faible, autour de 97% (figure VI.8 (a)).

Le taux de gonflement de l'hydrogel P3 dans la ABS à pH = 5,5, indique une valeur plus basse, autour de 80%, très inférieure au film P1 le moins réticulé, qui présente une valeur maximale autour de 125% (figure VI.8 (b)). Les valeurs plus faibles du degré de gonflement dans un milieu acide, par rapport à celles-ci dans un milieu faiblement basique, ont la même explication qui a été fournie dans le chapitre 5 : la formation des anions carboxylate de la CMCOx dans le milieu basique provoquent des répulsions électrostatiques plus fortes entre les chaînes des polymères (par rapport aux répulsions entre les cations d'ammonium provenant du chitosane, dans un milieu faiblement acide), et d'ici l'augmentation des mailles du réseau et donc la capacité plus élevée de l'eau de pénétrer/diffuser dans l'hydrogel.

VI.8. Etude du degré de gonflement dans les solutions tampons des films hydrogels à base de CS /LA/CMCOx qui contiennent le complexe d'inclusion curcumine/ β -cyclodextrine

Nous avons analysé une série de trois hydrogels, obtenus à trois rapports molaires des films résultant de la réticulation de CMCOx avec un mélange de chitosane et lactalbumine, et contenant le complexe d'inclusion de la cyclodextrine, du point de vue du processus de gonflement dans les deux solutions tampons de pH différent, comme antérieur (pH=5.5 et pH=7.4) (figure VI.10).

La figure VI.9 montre l'aspect des deux films contenant le complexe de la cyclodextrine. On peut constater que les films sont homogènes, translucides, et présentent évidemment la couleur imprimée par la curcumine, même si elle est incluse dans la cavité hydrophobe de la cyclodextrine.

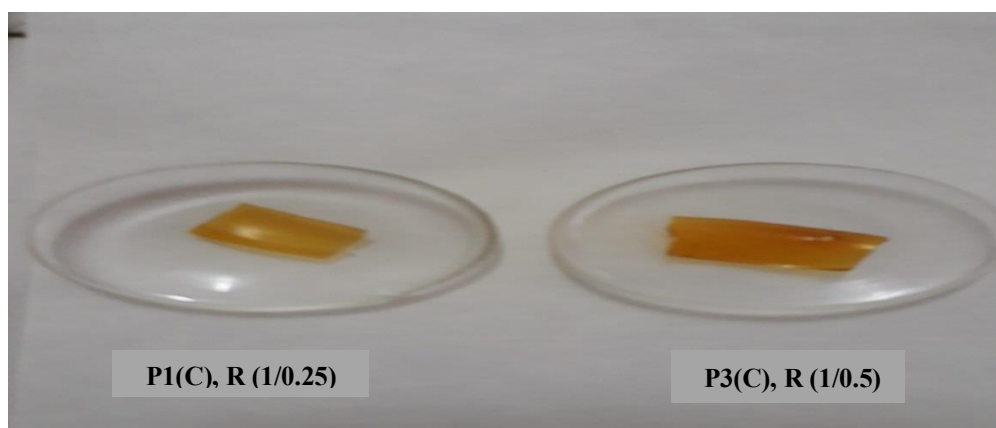


Figure VI.9 : Aspect des films à base de CS/LA/CMCOx contenant le complexe d'inclusion curcumine/ β -cyclodextrine: film P1 (gauche) et film P3 (droite).

On peut voir toujours que les hydrogels chargés du complexe de la curcumine, ayant un taux inférieur de réticulation gonflent plus que ceux qui ont un plus fort degré de réticulation. On vérifie encore une fois que la capacité de gonflement des hydrogels chargés du complexe de la curcumine dans les deux milieux étudiés est plus faible en milieu acide par comparaison au milieu faiblement basique.

Enfin, il est évident que les hydrogels élaboré à base de CS/LA/CMCOx qui ne contiennent pas le complexe, gonflent plus que les hydrogels chargés du complexe. L'explication est liée, d'une part, aux interactions physiques et de type liaisons d'hydrogène qui s'établissent entre les groupements $-OH$ de la cyclodextrine du complexe et les deux biopolymères de la composition des films, et d'autre part au fait que le complexe à une grande taille, qui occupe la plus grande partie de l'espace des mailles du réseau ; par conséquent, la quantité d'eau qui peut occuper ces espaces est plus diminuée.

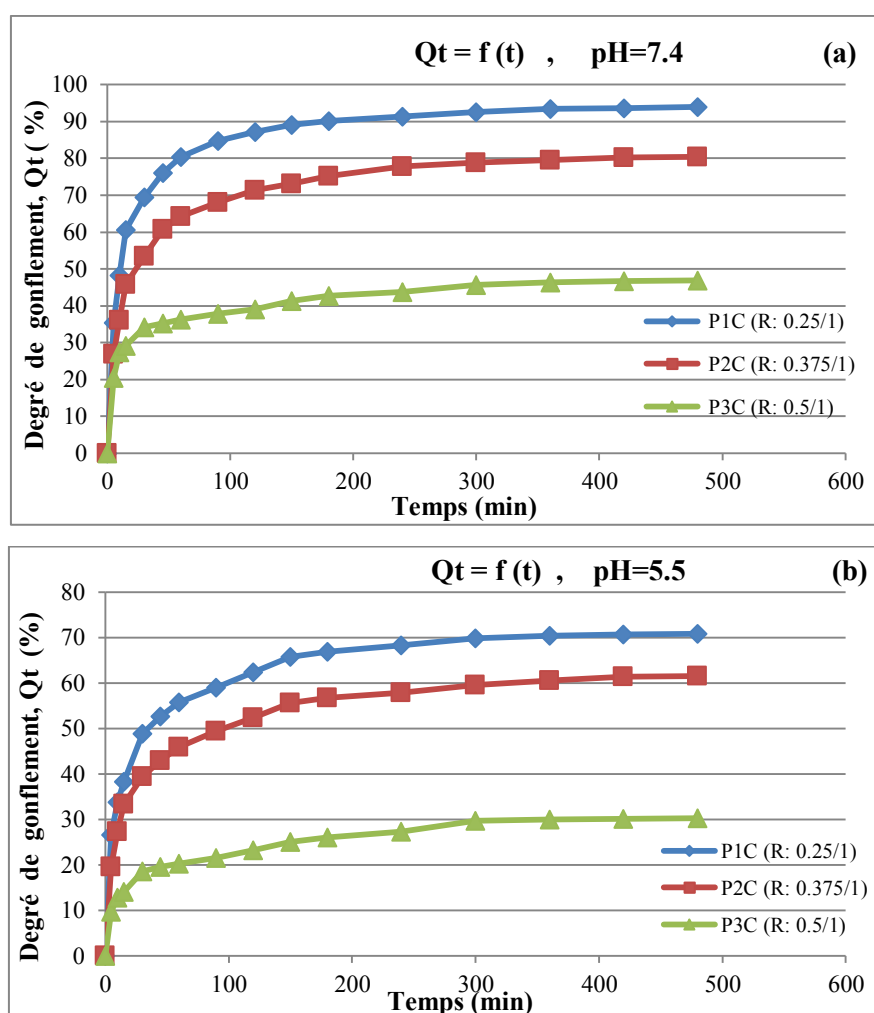


Figure VI.10: Variation du degré de gonflement en fonction du temps pour les films P1 (C), P2 (C) et P3 (C) (temps de réticulation de 3h, $T_{\text{reaction}} = 30^{\circ}\text{C}$) dans: (a) solution tampon phosphate à pH = 7,4 (b) solution tampon d'acétate à pH = 5,5.

Les observations discutées sont en concordance, comme on verra ultérieurement, avec les résultats de la cinétique de libération contrôlée de la curcumine présentés dans le paragraphe VI.12.

VI.9. Stabilité de la curcumine immobilisée à la lumière

La curcumine est sensible à la lumière et sa couleur change rapidement lorsqu'elle est exposée à la lumière naturelle [314,315]. Le processus de dégradation en présence de lumière est dû à la présence de groupes chromophores dans la curcumine. En supposant que la matrice polymère puisse protéger la curcumine contre les effets dégradants de la lumière, nous avons mené une étude sur trois films d'hydrogels contenant la curcumine incluse [P1(C), P2(C) et P3(C)], pour vérifier si la stabilité de ce produit est supérieure par rapport à la curcumine libre. Les films contenant la curcumine ainsi que la curcumine libre ont été exposés à la lumière pendant 30 jours, et de temps en temps on a déterminé le taux de curcumine non-dégradée, par l'extraction du polyphénol dans l'alcool. La dégradation a été évaluée par détermination de la valeur d'absorbance à la longueur d'onde UV spécifique ($\lambda = 425 \text{ nm}$), à la suite de la transformation de la curcumine en d'autres produits, un effet visible et par œil libre en raison d'une décoloration. Le tableau VI.2 présente le pourcentage de la curcumine restée non-dégradée, par rapport à la quantité de curcumine qui était immobilisée au départ dans les films, pour différentes périodes d'exposition à la lumière et à l'aire libre, pour trois échantillons.

Tableau VI.2: Résultats concernant la dégradation de la curcumine libre et immobilisée à la lumière (exposition à la lumière naturelle et à l'air libre pendant 30 jours), évaluée par le pourcentage de curcumine restée non-dégradée.

Durée (jours)	Curcumine non-dégradée (%)			
	P1(C)	P2 (C)	P3 (C)	Curcumine libre
0	100	100	100	100
2	97.0393	97.03591	94.97369	92.63692
4	94.88017	94.79214	91.71944	85.92292
7	93.47674	91.92186	87.63226	80.58824
10	91.20965	89.29926	80.6395	62.80933
13	88.14639	85.0157	70.41186	50.96349
15	87.05333	82.55337	63.10917	43.25558
17	84.67829	81.41692	59.87429	33.37728
20	82.07384	78.19696	55.76774	26.26775
22	81.61503	76.332	50.32463	21.3286
24	79.57735	73.06833	45.69507	19.16836
27	74.9892	67.1675	39.6321	11.65314
30	68.09349	56.09433	34.07275	6.713996

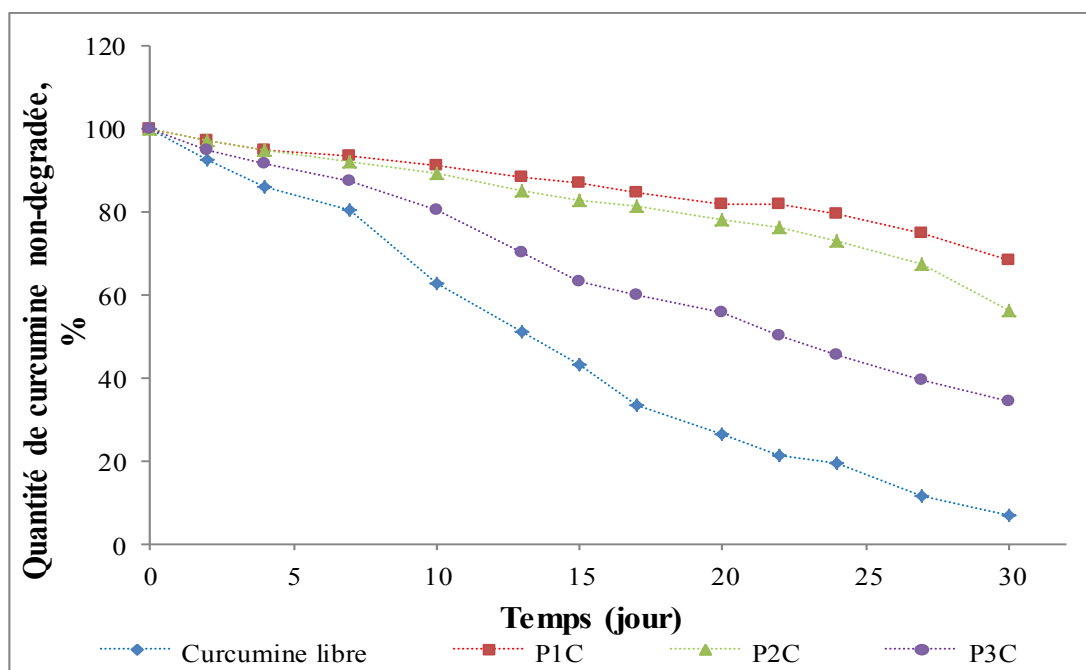


Figure VI.11: Variation pendant le temps du pourcentage de la curcumine non dégradée (%) pour une période de 30 jours d'exposition à l'air et à la lumière naturelle [curcumine libre, hydrogels P1(C), P2(C), P3(C)].

L'examen de la figure VI.11 montre l'abaissement de la quantité du curcumine restante non dégradée des films chargés P1(C), P2(C) et P3(C) ainsi la quantité du curcumine libre non dégradée après l'exposition à la lumière et à l'air libre pendant 30 jours.

Des études antérieures ont montré que la curcumine immobilisée dans les systèmes de libération obtenus par la méthode de l'émulsion se dégrade en présence de la lumière. Les auteurs ont montré qu'environ 50% de la curcumine dans l'émulsion était dégradée après exposition à la lumière [316].

Il est très évident le fait que la matrice polymère protège la curcumine contre la dégradation, la quantité de polyphénol non-dégradé étant plus élevée, pour tous les trois films, par rapport à la curcumine libre, pour toute la période d'exposition à l'air et à la lumière.

En général, la quantité de curcumine non-dégradée devient de plus en plus faible avec l'augmentation de taux de réticulation des films.

Ce résultat est, apparemment, surprenant. On s'attendait que, par l'augmentation du taux de réticulation des films la curcumine (sous forme de complexe) soit plus protégée. La seule explication possible pour nos résultats, qui prouvent le contraire est liée à l'épaisseur des films. Nous avons constaté que l'épaisseur des films diminue par l'augmentation du rapport CMCOx/chitosane, et varie de 20 à 12 μm (pour les mêmes quantités des polymères utilisées pour l'obtention de films, et le même poids des échantillons soumis à la dégradation). Donc, la radiation lumineuse peut pénétrer plus facilement dans le film, quand son épaisseur est plus faible. Par conséquent, la curcumine est plus exposée à la dégradation, à mesure que les films deviennent plus minces, ce qui explique et justifie nos résultats.

VI.10. Stabilité de la curcumine immobilisée à pH

Dans le sous chapitre antérieur nous avons démontré que la matrice polymère dans laquelle la curcumine a été incluse a un rôle protecteur et prévient la dégradation du produit sous l'action cumulée de la lumière et de l'air. On a voulu établir si la matrice polymère protège la curcumine, aussi, contre l'effet de dégradation produit par de solutions à différentes valeurs du pH.

Les échantillons de P1(C), P3(C) et la curcumine libre ont été sélectionnés pour cette étude. Le pH des solutions dont l'effet de dégradation a été suivi, avait différentes valeurs, à savoir: 2,16 ; 3 ; 5,5 ; 6,8 ; 7,4 et 9. La concentration de curcumine libre et immobilisée était de 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ et le test a été effectué à l'obscurité en l'absence d'air pour éviter toute une dégradation supplémentaire.

Les figures VI.12 et VI.13 présentent les résultats concernant tout d'abord la dégradation de la curcumine libre en fonction de la valeur du pH d'une part et d'autre part la cinétique de dégradation. En effet, dans les figures est représentée la variation de la quantité de curcumine non-dégradée, donc le pourcentage de curcumine trouvée en solution, le dosage étant fait par la spectroscopie UV.

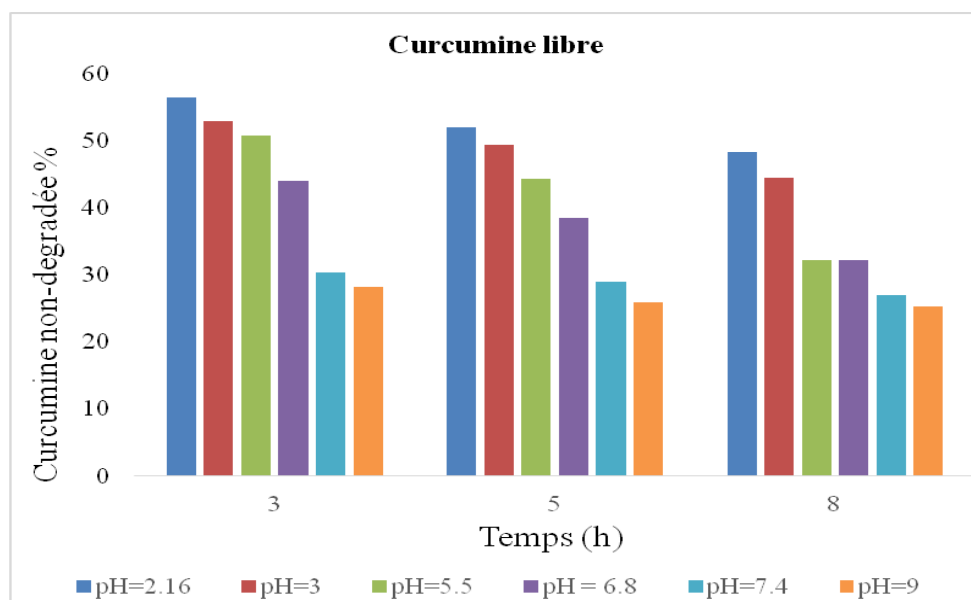


Figure VI.12: Le pourcentage de la curcumine non dégradée pour quelques durées d'exposition de la curcumine libre en solution, à des valeurs différentes du pH.

On constate dans la fig VI.12 que la dégradation devient de plus en plus intense avec l'augmentation du pH, effet qui a été signalé, aussi, et par d'autres auteurs [317].

Une image sur la cinétique de dégradation (exprimée par la variation pendant le temps de la curcumine non-dégradée), dans des milieux à des valeurs différentes de pH est offerte par la figure VI.13.

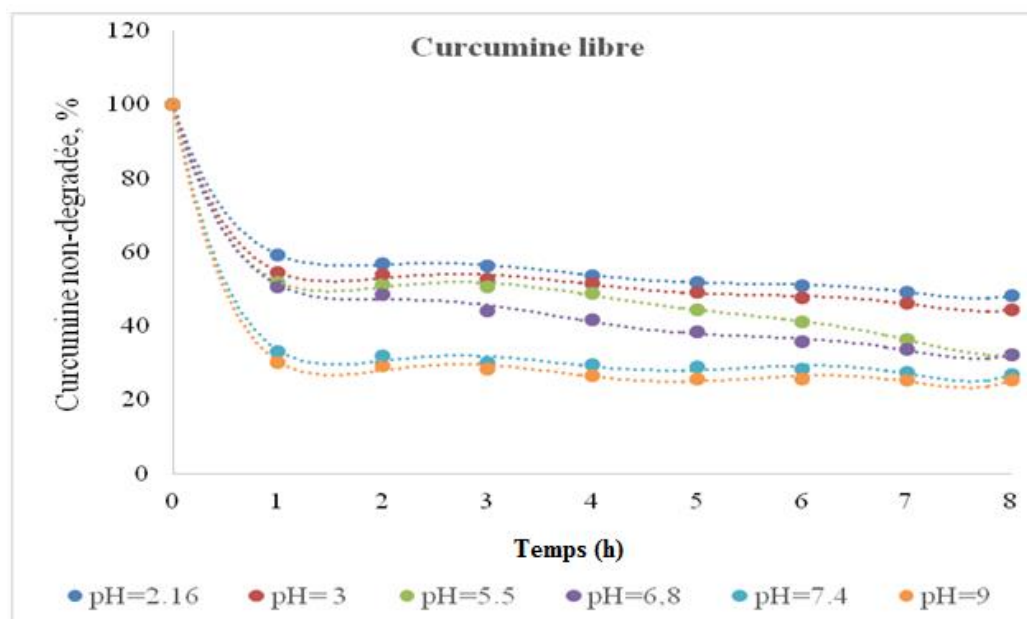


Figure VI.13: Variation pendant le temps du pourcentage de la curcumine non-dégradée provenant de la curcumine libre soumise à dégradation, à différentes valeurs du pH.

On constate que la dégradation de la curcumine dans les solutions tampons utilisées est spontanément. Le produit principal obtenu par dégradation est probablement le bicyclopentadione, le même qui s'obtient par la dégradation oxydative de la curcumine [317,318].

D'après les résultats obtenus, nous observons que la dégradation de la curcumine libre dans une solution à pH=2,16 est moins intense, et le temps de demi-vie, respectivement $t_{1/2} = 6,75$ h. Au delà de pH > 2,16, la dégradation de la curcumine libre commence à augmenter progressivement. Dans une solution à pH= 7,4 le $t_{1/2} = 3,67$ h, tandis que dans une solution à pH=9, le $t_{1/2}$ devient 3,36 h.

Le test de stabilité du pH a été également réalisé pour des films hydrogels chargés du complexe de la curcumine avec le cyclodextrine, respectivement les échantillons P1(C) et P3(C). La cinétique de dégradation (exprimée aussi par la variation du pourcentage de curcumine non-dégradée pendant le temps) pour l'échantillon P1(C) est présentée dans la figure VI.14.

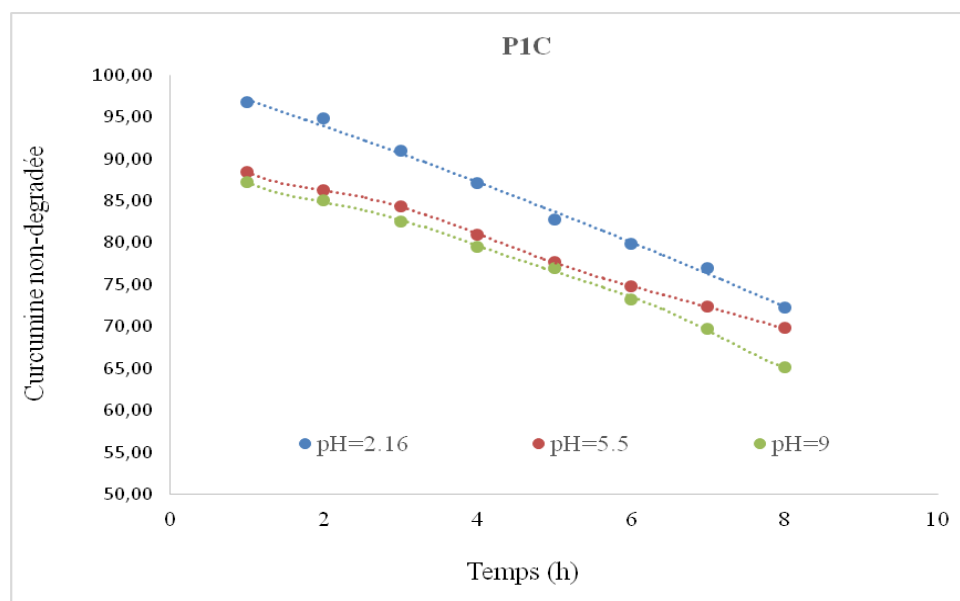


Figure VI.14 : Variation pendant le temps du pourcentage de la curcumine non-dégradée provenant du complexe de la curcumine dans le cyclodextrine, à différentes valeurs du pH [échantillon P1(C)].

Une première constatation est que la dégradation de la curcumine est, aussi, de plus en plus intense avec l'augmentation de la valeur du pH du milieu de la dégradation; la dégradation est plus forte au pH le plus élevée de l'expérimentation (pH=9).

La dégradation devient de plus en plus intense avec la durée, mais ce qui est très important, on constate que la dégradation de la curcumine immobilisée sous forme de complexe d'inclusion dans la matrice P1 est moins intense par rapport à la curcumine libre, ce qui signifie que la matrice polymère protège bien le polyphénol. En effet, il s'agit d'une double protection de la curcumine, offerte d'une part par la matrice polymère, est d'autre part par la cyclodextrine dont la cavité hydrophobe inclue la curcumine.

L'effet protecteur du film polymère est évident, aussi, dans le cas de l'échantillon P3(C).

La figure VI.15 montre le pourcentage de la curcumine non-dégradée extraite de ce film, après 3, 5 et 8 heures d'action des milieux à différentes valeurs du pH.

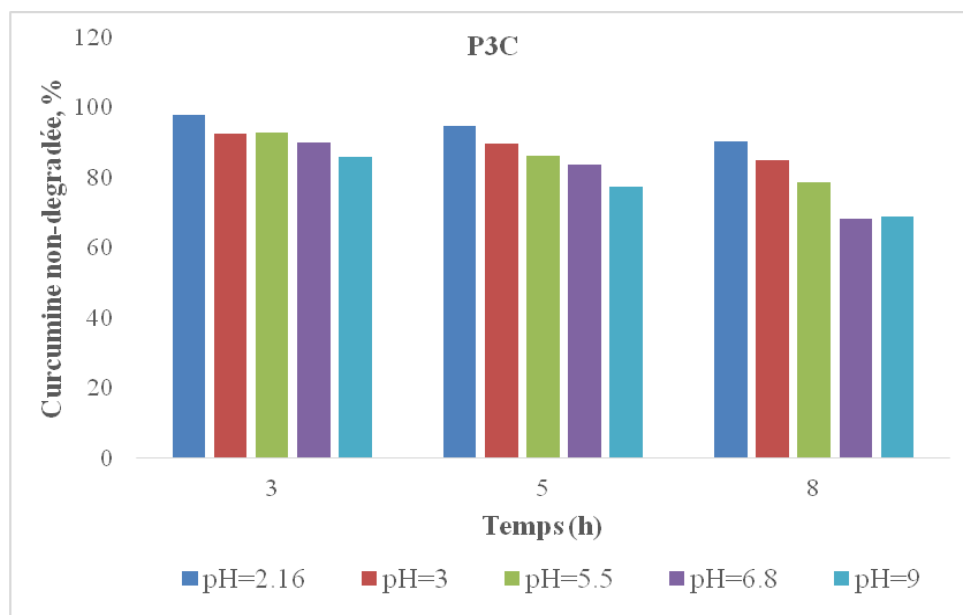


Figure VI.15 : Le pourcentage de la curcumine non-dégradée pour quelques durées d'exposition de l'échantillon P3(C) dans des solutions à différentes valeurs du pH.

On vérifie une fois de plus que le milieu le plus basique est le plus agressif, et provoque, donc, la dégradation la plus intense de la curcumine.

La cinétique de dégradation est présentée dans la figure (fig VI.14). Comme dans le cas de l'échantillon P1(C), la dégradation augmente avec le temps d'action du milieu agressif sur l'échantillon, et devient la plus intense pour un pH basique. Mais, on voit bien aussi que la dégradation est moins intense par rapport avec la dégradation de la curcumine libre, et même par rapport avec la dégradation de la curcumine incluse dans l'échantillon P1(C).

Donc, on vérifie une fois de plus que la matrice polymère protège le polyphénole contre la dégradation. D'autre part, la protection assurée par la matrice P3, qui présente un taux de réticulation plus élevé par rapport à la matrice P1. L'explication est la suivante. On a vu antérieurement que le degré de gonflement de l'échantillon P1(C) est presque deux fois plus élevé par rapport à l'échantillon P3(C). Donc, pendant le temps, le volume de la solution aqueuse à différentes valeurs du pH, qui pénètre dans la matrice polymère, est plus élevé.

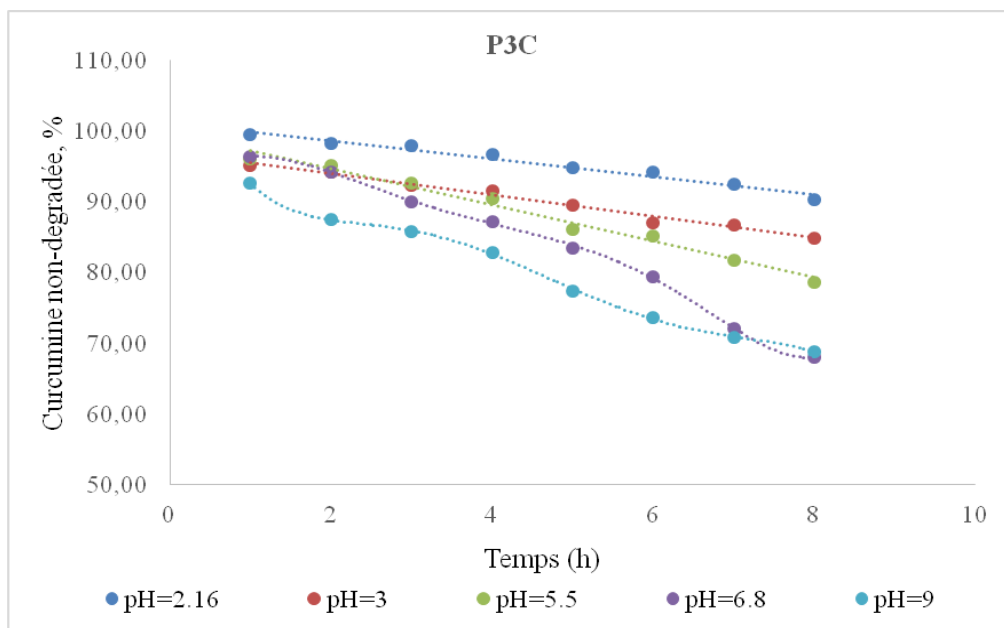


Figure VI.16 : Variation pendant le temps du pourcentage de la curcumine non-dégradée provenant du complexe de la curcumine dans le cyclodextrine, à différentes valeurs du pH [échantillon P3(C)].

Par conséquent, le complexe de la curcumine avec la cyclodextrine, inclus dans la matrice polymère, sera en contact avec une quantité plus élevée d'agent agressif ; évidemment, la dégradation du polyphénol sera plus intense à cause du volume plus élevé de solution (acide soit alcaline) avec laquelle il va entrer en contact.

En conclusion, on peut affirmer que la matrice polymère protège la curcumine contre l'effet de dégradation induit par un milieu à caractère acide soit alcaline, mais le dernier produit une dégradation plus intense, effet qui se vérifie aussi pour la curcumine libre soumise à la dégradation.

VI.11. Cinétique de libération de la curcumine *in vitro*

Cette étude a eu pour but d'établir la capacité des films contenant le complexe de curcumine immobilisée, de libérer le produit biologiquement actif dans des milieux différents qui simulent les fluides biologiques. On a cherché une corrélation entre cette capacité et le taux de réticulation des films, respectivement le rapport entre les groupements aldéhydes provenant de CMCOx et les groupements amines provenant de chitosane et lactalbumine.

Le processus de libération a été étudié *in vitro*, quand les films contenant le complexe d'inclusion immobilisé ont été suspendus directement dans la solution buffer, à différentes valeurs du pH. Pour cette étude on a sélectionné trois films en différents rapports molaires, respectivement P1(C), P2(C) et P3(C).

Le process de libération de la curcumine a été étudiée dans deux milieux de pH différents: solution tampon phosphate à $\text{pH} = 7,4$ et solution tampon acétate à $\text{pH} = 5,5$ et à la température physiologique ($T = 37\text{ }^\circ\text{C}$), jusqu'à l'équilibre. Les films analysés ont été suspendus dans la solution buffer, et de temps en temps ont été prélevés de volumes constants de solution dans lesquels on a déterminé la quantité de curcumine libérée (UV, $\lambda = 425\text{ nm}$).

Les courbes de cinétique de libération pour les échantillons analysés sont représentées dans la figure VI.17 (a et b). Elles expriment la variation dans le temps de l'efficacité de la libération, respectivement le pourcentage de curcumine libérée par rapport à la quantité totale de curcumine immobilisée dans les films.

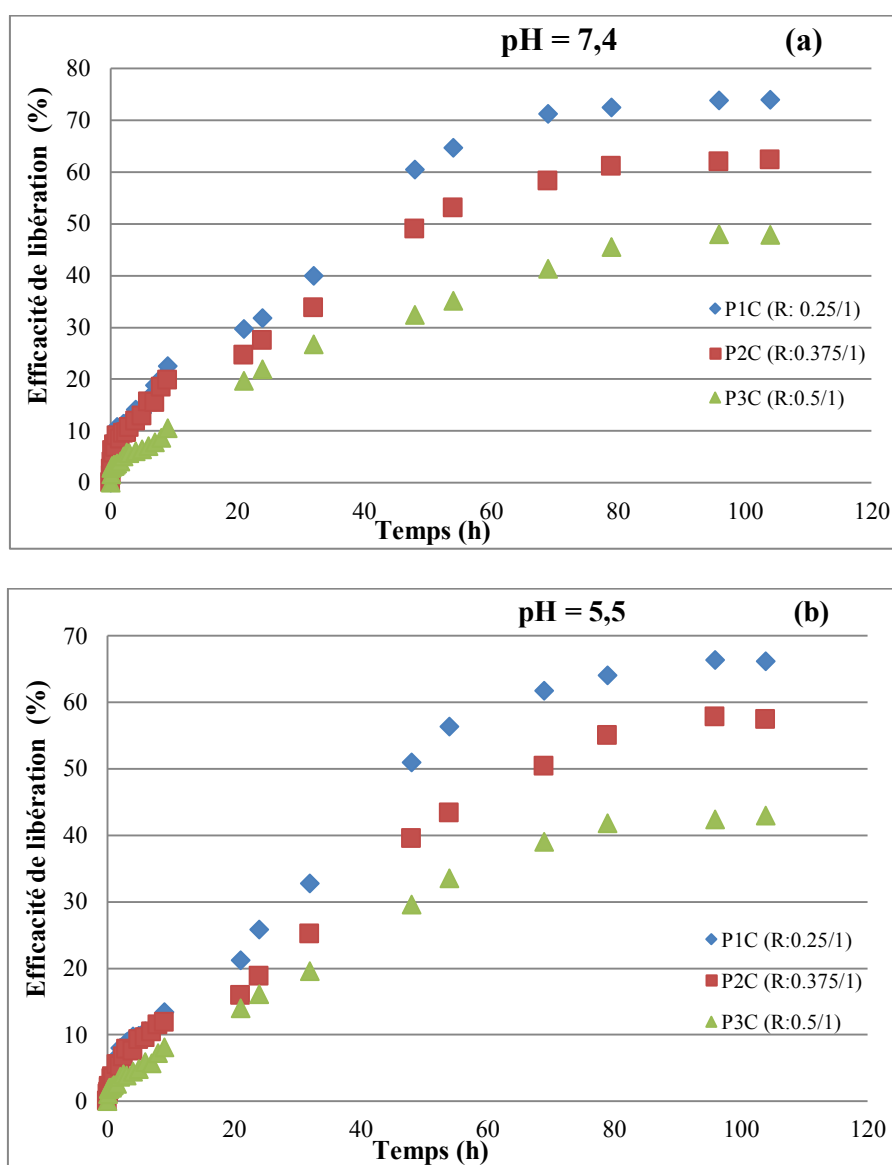


Figure VI.17 : La cinétique de libération de la curcumine pour les 3 films biopolymères: (a) P1(C), P2(C), P3(C) à $\text{pH} = 7,4$; (b) P1(C), P2(C), P3(C) à $\text{pH} = 5,5$.

Pour tous les échantillons analysés on constate que l'allure des courbes cinétiques est typique aux systèmes diffusionnels à libération soutenue. Très important à constater c'est le fait que le « burst effet » est moins intense par rapport à la libération de la curcumine libre immobilisée dans des films à base que de chitosane et CMCO (voir chapitre 5).

On peut expliquer ce résultat par deux effets. Premièrement il y a deux barrières devant la diffusion de la curcumine dans le cas des films chargés du complexe ; d'une part elle devrait sortir de la cavité hydrophobe de la cyclodextrine, et d'autre part elle doit traverser la matrice polymère qui devient de plus en plus dense par l'augmentation du taux de réticulation (donc du taux de CMCOx utilisé), et fait que la diffusion du produit actif est plus lente. D'autre part, la curcumine, qui est hydrophobe, peut engager des interactions de type hydrophobe-hydrophobe avec les domaines hydrophobes de la lactalbumine, ce qui peut retarder la libération. Par conséquent, on n'aura pas une libération rapide des premiers moments du processus, et le « burst effet » est plus faible.

On constate que la densité de réticulation des films joue fortement sur la cinétique de libération de la curcumine ; l'effet est tout à fait logique, parce que la diffusion de produit actif sera de plus en plus difficile, comme on disait antérieurement, par l'augmentation du taux de réticulation. Cette dépendance de la cinétique de libération, du taux de réticulation est visible dans les deux milieux de pH différents qu'on a utilisé (fig. VI.17 a et b). Jusqu'à environ 70 heures, la vitesse de libération est presque constante (la variation de l'efficacité de libération en fonction du temps est presque linéaire) ; après cette période la vitesse commence à diminuer jusqu'à ce qu'elle atteigne le plateau (après environ 100 heures du processus).

La valeur du pH influence, aussi, la vitesse de libération. Celle-ci est plus élevée quand le milieu de libération est faiblement basique (pH=7,4). On a constaté le même effet pour les films à base de chitosane et CMCOx (chapitre 5) et on a expliqué cet effet à cette occasion. C'est important à souligner le fait que les résultats concernant la cinétique de libération sont en très bonne corrélation avec ceux concernant la variation du degré de gonflement dans les deux milieux à pH différent, et bien sûr, en fonction du taux de réticulation des films. L'effet est logique, étant donné que tous les deux processus ont à la base le processus de diffusion des molécules soit d'eau, soit de la curcumine, par la matrice polymère.

Les informations sur le mécanisme de transport et de libération de la curcumine dans la matrice polymère aux films hydrogels ont été obtenues en utilisant le modèle cinétique de Ritger-Peppas selon l'équation VI.1 [268].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 \times t^n \quad (\text{eq VI.1})$$

Tableau VI.3: Les valeurs du facteur exponentiel n autorisé.

Echantillon	Efficacité de libération du curcumine dans les films hydrogels Après 100 h , (%)		Facteur exponentiel (n)	
	pH = 7.4	pH = 5.5	pH = 7.4	pH = 5.5
P1(C) , (R : 0.25/1)	73,97	66,19	0,4861	0,6203
P2(C) , (R :0.375/1)	62,32	57,43	0,477	0,5685
P3(C) , (R :0.5/1)	47,84	42,98	0,4838	0,5446

On constate que, pour la libération dans le milieu faiblement basique (pH = 7.4) , les valeurs de n sont proches de 0,5 ce qui indique une diffusion pratiquement de type Fickien. Pour la libération dans le milieu acide, (pH = 5.5) , les valeurs de n indique une diffusion quasiment Fickien mais perturbée par certains facteurs, par exemple par l'érosion de la matrice polymère.

VI.12. Conclusion

On a obtenu des films originaux à caractère hydrogel capables d' inclure le complexe d'inclusion curcumine/ β -cyclodextrine. Les propriétés physico-chimiques des films dépendent de leur composition ainsi que de la présence du complexe dans la matrice polymère.

Le taux de gonflement en milieu aqueux et la capacité de libération des composés hydrosolubles modèles (la curcumine) dépendent de la composition des hydrogels. Le degré maximal de gonflement et la quantité de curcumine libérée augmentent avec la diminution de la quantité d'agent de réticulation, respectivement du rapport $-\text{CH}=\text{O}/-\text{NH}_2$.

Le taux de gonflement et la capacité de libération dans la solution PBS (pH=7.4) présentent les meilleurs résultats que ceux dans la solution ABS (pH=5.5).

La matrice polymérique des hydrogels obtenus à base de CS/LA réticulé avec la CMCOx chargé du complexe de la curcumine assure une meilleure protection contre la dégradation du curcumine, due à la lumière et au milieu agressif (acides, basiques).

Conclusions
générales et
perspectives

Conclusions générales et perspectives

L'ensemble des travaux que nous avons réalisés présente dans un premier temps l'étude de la modification chimique qui concerne l'oxydation de la carboxyméthylcellulose par le périodate de sodium, NaIO_4 , ensuite l'obtention des hydrogels sous forme de films à base de chitosane et de lactalbumine réticulé par la carboxyméthylcellulose oxydée sont également étudiés, et enfin l'étude de la cinétique d'inclusion et de libération de principes actifs libres (curcumine). Dans cette recherche, nous nous sommes intéressés aux hydrogels de chitosane et de lactalbumine réticulée à l'aide d'un composé qui contient des groupements carbonyle, respectivement la CMCOx. Notre travail expérimental était de décrire l'évolution de la structure des réseaux de chitosane au cours de la gélification en fonction de certains paramètres physicochimiques pour des réseaux de chaînes de chitosane et CMCOx, ou semi-interpénétrés avec de l'actalbumine et d'étudier les propriétés de réticulation dans les gels formés. À la fin de chaque chapitre qui rend compte des résultats de la recherche obtenus dans les trois parties étudiées, les conclusions de l'étude ont été présentées. Celles-ci ont permis d'établir les conclusions générales qui seront présentées ci-après.

1. Des dosages des groupements carbonyles dans la structure de CMCOx montrent que lorsque la concentration en agent oxydant, périodate de sodium est diminué suite à la réaction, le taux des carbonyles (%) augmente. En revanche, l'oxydation de CMC par le périodate de sodium (NaIO_4) favorise l'augmentation avec le temps des teneurs en aldéhydes en fonction de la concentration de NaIO_4 .

2. L'oxydation de la CMC par le périodate de sodium (NaIO_4) et la formation de groupements aldéhyde ($-\text{CH}=\text{O}$) a été démontrée par la spectroscopie FT-IR et RMN. Le degré d'oxydation du polysaccharide augmente avec le temps, sa valeur maximale étant environ de 22,9%. La CMC a été dégradée pendant la réaction d'oxydation; sa masse moléculaire a été diminuée lorsque le temps d'oxydation augmente, jusqu'à la valeur 83,6 KDa après 6 heures d'oxydation.

3. La CMCOx participe à la réticulation covalente par la réaction entre les groupements amines de CS et les fonctions aldéhydes de CMCOx dans la formation de base schiff entre les chaînes de deux polymères.

4. Des films d'hydrogel ont été élaborés en utilisant différents rapports molaires entre les groupes aldéhydes ($-\text{CH}=\text{O}$) de CMCOx et les groupements amines ($-\text{NH}_2$) de CS. La spectroscopie FT-IR a confirmé la formation des bases de Schiff ($-\text{C}=\text{N}$) dans les films d'hydrogel obtenus.

5. Le taux de conversion des groupements amines dans les bases de Schiff, DC_{amine} dépend de plusieurs facteurs d'influence tels que la concentration de CMCOx dans la composition du film, les interactions intermoléculaires entre les polysaccharides constitutifs, le temps et la température de réticulation. Il a été constaté que certains des groupements amines de CS sont impliqués dans de fortes interactions intermoléculaires avec les groupes carboxyliques de CMCOx, leur réaction avec la ninhydrine était restreinte et les valeurs de DC des groupes amines étaient dénaturées.

6. Le degré de réticulation augmente avec la croissance du degré d'oxydation de la carboxyméthylcellulose, tandis que le taux de gonflement diminue.

7. Le degré de gonflement déterminé dans deux milieux de pH différents (pH = 5,5 et pH = 7,4) augmente lorsque la quantité de CMCOx diminue dans le film, ainsi que lorsque la valeur de DC des groupes amines diminue. La température de réticulation et le temps de réticulation des films obtenus influencent significativement sur le degré de gonflement, obtenant une valeur maximale à la température de 60 °C et un temps de réticulation court (une heure). Les valeurs de DC_{amine} diminuent avec l'augmentation de la température et du temps de réticulation. Des valeurs plus élevées du degré de gonflement ont été obtenues à pH = 7,4 par rapport à celles à pH = 5,5 en raison de la présence dans le film de groupes carboxyliques libres de CMCOx, ce qui provoque de fortes répulsions électrostatiques entre les anions de carboxylate, et l'absorption d'une plus grande quantité de solutions aqueuses.

8. L'analyse morphologique de la surface des films par MEB a montré que la porosité et la rugosité des hydrogels diminuent avec l'augmentation de la quantité de CMCOx dans leur composition. Plus la porosité des films augmente, le degré de réticulation diminue, ce qui implique un degré de gonflement plus élevé.

9. La stabilité thermique des films dépend du degré de réticulation. L'analyse thermogravimétrique a montré que la perte de poids maximale est inférieure pour les échantillons avec un degré de réticulation plus élevé dans le cas du film P3.

10. La curcumine a été incluse dans les films d'hydrogel par la méthode de diffusion et évaporation de l'alcool. L'efficacité d'immobilisation de la curcumine est élevée, si elle est initialement dissoute dans l'alcool éthylique qui est ensuite éliminé par évaporation; l'augmentation de la densité de réticulation de la matrice entraîne une diminution de la quantité de curcumine encapsulée.

11. La cinétique de libération de la curcumine du film et la perméabilité ont été étudiées dans des solutions tampons de pH = 5,5 et pH = 7,4 à travers une membrane de peau de poulet, en utilisant une cellule de diffusion Franz. Les résultats ont montré que la libération de

la curcumine à partir des films s'intensifiait à pH = 7,4. Pourtant, à pH = 5,5, il y a une plus grande absorption de la quantité de curcumine dans la membrane de peau, ce qui rend l'efficacité de libération totale plus élevée à pH = 5,5.

12. La curcumine chargée dans les films d'hydrogel conserve son activité antioxydante et le CS contribue à son augmentation. L'obtention de films d'hydrogel à base de CS réticulés avec des groupes aldéhyde de CMCOx peut être optimisée pour diverses applications telles que les applications biomédicales.

13. La stabilité structurelle des hydrogels, leurs caractéristiques morphologiques, les propriétés de gonflement en milieu aqueux et les performances dans les processus de libération contrôlée sont influencées par la quantité d'agent de réticulation utilisée à la fois dans la phase de réticulation. Des quantités plus importantes d'agent de réticulation augmentent la stabilité structurelle et également la densité de réticulation, en réduisant à la fois le degré de gonflement dans l'eau, ainsi que la capacité de libération du curcumine immobilisé car cela provoque une diffusion plus lente du principe actif.

14. Des mélanges de trois polymères - chitosane, lactalbumine et carboxyméthylcellulose oxydée dans des différentes proportions peuvent être réticulés par des liaisons de type base schiff (-C=N), et les caractéristiques structurelles et physico-chimiques des hydrogels obtenus sont influencées par le rapport des polymères. Ayant en vue la présence des groupes amines dans le chitosane et lactalbumine, ainsi que le fait que la réaction de réticulation se développe dans un milieu acide, la CMCOx utilisée comme réticulant réagit par l'intermédiaire de ses groupements aldéhydes et finalement les matrices résultantes ont une structure complexe, étant de type réseau interpénétrés / interconnectés.

15. Le rapport de l'association de lactalbumine avec la carboxyméthylcellulose oxydée est un facteur qui influence la densité de réticulation de la matrice, et donc la stabilité, le comportement au gonflement en milieu aqueux et la capacité de libération de médicament.

16. L'utilisation de lactalbumine dans la composition de la matrice polymère entraîne une morphologie différente, ce qui conduit à une intensification du phénomène de diffusion de la curcumine dans le processus de libération.

17. Les caractéristiques de gonflement dans l'eau et la quantité de curcumine libérée par les films d'hydrogels préparés dans différents milieux de pH sont améliorées en réduisant le degré de réticulation.

18. Les gels obtenus sont de matrices appropriées pour l'immobilisation de la curcumine, afin d'obtenir des films, potentiellement utilisables pour le traitement de certaines affections de la peau.

19. Les polysaccharides cationiques sont des candidats importants pour le développement de matrices pour l'immobilisation de la curcumine, conduisant à de nouvelles formulations biomédicales.

20. Le profil de libération de la curcumine est spécifique aux films hydrogels obtenus CS/LA/CMCOx dans deux milieux, un milieu acide simulant au pH de la peau et un milieu faiblement basique simulant au pH du sang. Le processus se déroule avec une efficacité plus élevée dans le pH basique.

21. Les hydrogels obtenus à base de CS, LA et de la CMCOx, par réticulation covalente peuvent constituer des matrices pour l'inclusion et la libération des médicaments hydrosolubles, ces processus dépendant de la composition, la nature et la quantité d'agents de réticulation utilisés.

22. Les tests de stabilité de la curcumine immobilisée à la lumière et aux pH confirment que la matrice polymérique des hydrogels obtenus à base de CS/LA réticulé avec la CMCOx chargé du complexe d'inclusion (β -cyclodextrine/ curcumine) joue un rôle très important dans la protection contre la dégradation du curcumine. La curcumine est protégée de la photodégradation lorsqu'elle est immobilisée dans des films d'hydrogels à base de CS/LA/CMCO obtenus par réticulation covalente.

23. En raison de l'immobilisation de la curcumine dans les films hydrogels, la stabilité de la curcumine en milieu aqueux a été augmentée et sa dégradation dans les différentes solutions tampons de pH a été diminuée.

24. Les tests de libération *in vitro* ont montré que la biodisponibilité de la curcumine était accrue par rapport à celle de la curcumine libre.

En conclusion, on peut dire que l'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse, qui ont conduit à l'obtention des films à caractère d'hydrogels chargés des médicaments, présentent des perspectives d'être utilisés pour des applications biomédicales, en particulier pour le traitement de certaines affections de la peau.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

- [1]: Zagórska-Dziok, M.; Sobczak, M. "Hydrogel-Based Active Substance Release Systems for Cosmetology and Dermatology Application". *A Review. Pharmaceutics*. 2020, 12, 396.
- [2]: Donnelly, R.F.; Singh, T.R.R.; Morrow, D.I.; Woolfson, A.D. "Microneedle-Mediated Intradermal Delivery. In *Microneedle-Mediated Transdermal and Intradermal Drug Delivery*". ; Donnelly, R.F.; Singh, T.R.R.; Morrow, D.I.; Woolfson, A.D, Eds; John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken, NJ, USA, 2012, 113–151.
- [3]: Larrañeta, E.; Stewart, S.; Ervine, M.; Al-Kasasbeh, R.; Donnelly, R.F. "Hydrogels for Hydrophobic Drug Delivery: Classification, Synthesis, and Applications". *J. Funct. Biomater*. 2018, 9.
- [4]: Benson, H.A.E.; Grice, J.E.; Mohammed, Y.; Namjoshi, S.; Roberts, M.S. "Topical and Transdermal Drug Delivery: From Simple Potions to Smart Technologies". *Curr. Drug Deliv*. 2019, 16, 444–460.
- [5]: Ruela, A.L.M.; Perissinato, A.G.; de Sousa Lino, M.E.; Mudrik, P.S.; Pereira, G.R. "Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations". *Braz. J. Pharm. Sci*. 2016, 52, 527–544.
- [6]: Dos Santos, V.; Brandalise, R.N.; Savaris, M. "Characteristics and Properties, in Engineering of Biomaterials ". *Springer International Publishing*, 2017, 5-15.
- [7]: Chai, Q.; Jiao, Y.; Yu, X. " Review Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them". *Gels*, 2017, vol. 3, nr. 6, 2-15.
- [8]: Li, J.; Mooney, D. J. "Designing hydrogels for controlled drug delivery". *Nat. Rev. Mater*. 2016, 1, 16071.
- [9]: Miao, T.; Wang, J.; Zeng, Y.; Liu, G.; Chen, X. "Polysaccharide-Based Controlled Release Systems for Therapeutics Delivery and Tissue Engineering: From Bench to Bedside." *Adv Sci (Weinh)*. 2018, 5, 1700513.
- [10]: Sogias, I.A.; Williams, A.C.; Khutoryanskiy, V.V. "Why Is Chitosan Mucoadhesive? ". *Biomacromolecules*. 2008, 9, 1837-1842.
- [11]: Islam, S.; Bhuiyan, M.A.R.; Islam, M.N. "Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering". *J. Polym. Environ*. 2017, 25, 854–866.
- [12]: Aguilar, A.; Zein, N.; Harmouch, E.; Hafdi, B.; Bornert, F.; Offner, D.; Clauss, F.; Fioretti, F.; Huck, O.; Benkirane-Jessel, N.; Hua, G. "Application of Chitosan in Bone and Dental Engineering". *Molecules*. 2019, 24, 3009.
- [13]: Zhao, D.; Yu, S.; Sun, B.; Gao, S.; Guo, S.; Zhao, K. "Biomedical Applications of Chitosan and Its Derivative Nanoparticles". *Polymers*. 2018, 10, 462.
- [14]: Cheung, R.C.F.; Ng, T.B.; Wong, J.H.; Chan, W.Y. "Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications". *Mar. Drugs*. 2015, 13, 5156-5186.
- [15]: Martínez-Martínez, M.; Rodríguez-Berna, G.; Bermejo, M.; Gonzalez-Alvarez, I.; Gonzalez-Alvarez, M.; Merino, V. "Covalently crosslinked organophosphorous derivatives-chitosan hydrogel as a drug delivery system for oral administration of camptothecin". *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2019, 136, 174–183.
- [16]: Sharma, P.K.; Halder, M.; Srivastava, U.; Singh, Y. "Antibacterial PEG-Chitosan Hydrogels for Controlled Antibiotic/Protein Delivery". *ACS Appl. Bio Mater*. 2019, 2, 5313–5322.
- [17]: Akakuru, O.U.; Isiuku, B.O. "Chitosan Hydrogels and their Glutaraldehyde-Crosslinked Counterparts as Potential Drug Release and Tissue Engineering Systems - Synthesis, Characterization, Swelling Kinetics and Mechanism." *J. Phys. Chem. Biophys*. 2017, 7, 100256.

- [18]: Hoffmann, B.; Seitz, D.; Mencke, A.; Kokott, A.; Ziegler G. "Glutaraldehyde and oxidized dextran as crosslinker reagents for chitosan-based scaffolds for cartilage tissue engineering". *J. Mater. Sci. Mater. Med* 2009, 20, 1495–1503.
- [19]: Huang-Lee, L.L.H.; Cheung, D.T.; Nimni, M.E. "Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived cross-links". *J. Biomed. Mater. Res.* 1990, 24, 1185–1201.
- [20]: Aramwit, P.; Ekasit, S.; Yamdech, R. "The development of non-toxic ionic-crosslinked chitosan-based microspheres as carriers for the controlled release of silk sericin". *Biomed. Microdevices.* 2015, 17, 84.
- [21]: Baron, R.I.; Culica, M.E.; Biliuta, G.; Bercea, M.; Gherman, S.; Zavastin, D.; Ochiuz, L.; Avadanei, M.; Coseri, S. "Physical Hydrogels of Oxidized Polysaccharides and Poly(Vinyl Alcohol) for Wound Dressing Applications". *Materials* 2019, 12, 1569.
- [22]: George, D.; Maheswari, P. U.; Begum, K. M. S. "Synergic formulation of onion peel quercetin loaded chitosan-cellulose hydrogel with green zinc oxide nanoparticles towards controlled release, biocompatibility, antimicrobial and anticancer activity". *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, 132, 784–794.
- [23]: Larasati, Y.A.; Yoneda-Kato, N.; Nakamae, I.; Yokoyama, T.; Meiyanto, E.; Kato, J.Y. "Curcumin targets multiple enzymes involved in the ROS metabolic pathway to suppress tumor cell growth". *Sci. Rep* 2018, 8, 1–13.
- [24]: Iurciuc-Tincu, C.E.; Cretan, M.S.; Purcar, V.; Popa, M.; Daraba, O.M.; Atanase, L.I.; Ochiuz, L. "Drug Delivery System Based on pH-Sensitive Biocompatible Poly(2-vinyl pyridine)-b-poly(ethylene oxide) Nanomicelles Loaded with Curcumin and 5-Fluorouracil". *Polymers.* 2020, 12, 1450.
- [25]: Dellali, M.; Iurciuc-Tincu, C.E.; Lenuta-Savin, C.; Spahis, N.; Djennad, M.; Popa, M. "Hydrogel Films Based on Chitosan and Oxidized Carboxymethylcellulose Optimized for the Controlled Release of Curcumin with Applications in Treating Dermatological Conditions". *Molecules.* 2021, 26, 2185.
- [26]: Desbrieres, J.; Peptu, C.A.; Savin, C.; Popa, M. "Chemically modified polysaccharides with applications in nanomedicine, in Biomass as renewable raw materials for bioproducts". Ed. *Elsevier*, 2018, 372-399.
- [27]: Svagan, A.J.; Azizi Samir, M.A.S.; Berglund, L.A. "Biomimetic Polysaccharide Nanocomposites of High Cellulose Content and High Toughness". *Biomacromolecules*, 2007, 8, 2556–2563.
- [28]: Jarroux, N. "Les biopolymères: différentes familles, propriétés et applications". *Technique de l'ingénieur* 2008, AM3580.
- [29]: Boukhalfa, N.; Djebri, N.; Boutahala, M. "Les polysaccharides cellulosiques et leurs applications dans le domaine de la santé : Exemple de la préparation des pansements cicatrisants". *Algerian.journal.of.arid .environnement.* 2017, vol. 7, n°2, 90-96.
- [30]: Berand, J. "Le technicien d'analyses biologiques ; *Guide théorie et pratique*". 2ème éd., Tec & Doc, Paris, 2001, 177.
- [31]: Marie-Carole Kouassi. "Polysaccharides fonctionnalisés par des composés d'origine naturelle aux propriétés antioxydantes et antibactériennes. Chimie organique". Thèse de doctorat. 2017. Normandie Université. Français.
- [32]: Massimiliano, F.; Susanna, G. "Advances in Chitin and Chitosan Science". *Molecules.* 2021, 26, 1805.
- [33]: Al Sagheer, F.A.; Al-Sughayer, M.A.; Muslim, S.; Elsabee, M.Z. "Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf". *Carbohydrate.Polymers.* 2009, 77, 410–419.
- [34]: Sokker, H.H.; Abdel Ghaffar, A.M.; Gad, Y.H.; Aly, A.S. "Synthesis and characterization of hydrogels based on grafted chitosan for the controlled drug release". *Carbohydrate.Polymers.* 2009, 75, 222–229.

- [35]: Guliyeva, U.; Oner, F.; Ozsoy,.; Haziro-lu, R. " Chitosan microparticles containing plasmid DNA as potential oral gene delivery system ". *European.Journal. of.Pharmaceutics.Biopharmaceutics*. 2006, 32, 17–25.
- [36]: Mohammad-Rahat, H.; Abul, K.M.; Mohammed-Mizanur, R. "Handbook of Chitin and Chitosan. Chapter 13 - Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering ". *Elsevier*. 2020, 407-431.
- [37]: Benbettaieb Nasreddine. "Influence de traitements de réticulation sans solvant sur les propriétés de films à base de gélatine et chitosan encapsulant ou non des antioxydants naturels : caractérisations physico-chimiques et application". Thèse de doctorat. 2015. Université de Bourgogne. Français.
- [38]: Dellali, K. Z.; Rata, D. M.; Popa, M.; Djennad, M.; Ouagued, A.; Gherghel, D. " Antitumoral Drug: Loaded Hybrid Nanocapsules Based on Chitosan with Potential Effects in Breast Cancer Therapy ". *International. Journal of Molecular.Sciences*. 2020, 21(16), 5659.
- [39]: Rayssa de Sousa, V.; Adillys Marcelo da Cunha, S.; Viana de Sous, B.; Gelmires de Araújo, N.; Lisiane Navarro de Lima, S.; Romualdo Rodrigues, M. " A Review on Chitosan's Uses as Biomaterial: Tissue Engineering, Drug Delivery Systems and Cancer Treatment ". *Materials*. 2020, 13, 4995.
- [40]: Braga, M.E.M.; Vaz Pato, M.T.; Costa Silva, H.S.R.; Ferreira, E.I.; Gil, M.H.; Duarte, C.M.M.; Sousa, H.C. " Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives ". *J.Supercritical.Fluids*. 2008, 44, 245–257.
- [41]: Hayashi, Y.; Ohara N.; Ganno, T.; Ishizaki, H. ; Yanagiguchi, K. "Chitosan-containing gum chewing accelerates antibacterial effect with an increase in salivary secretion ". *Journal.Dentistry*. 2007, 35, 871–874.
- [42]: Vongchan, P.; Sajomsang, W.; Subyen, D.; Kongtawelert, P. "Anticoagulant activity of a sulfated chitosan, ". *Carbohydrate.Research*. 2002, 337, 1239–1242.
- [43]: Menon , D.; Thomas , R.T.; Narayanan , S.; Maya , S.; Jayakumar , R.; Hussain , F.; Lakshmanan ,V.K.; Nair , S.V. " A novel chitosan/polyoxometalate nano-complex for anticancer applications," *Carbohydrate.Polymers*. 2011, 84, 887–893.
- [44]: Kim , I.Y.; Seo , S.J.; Moon , H.S.; Yoo , M.K.; Park , I.Y.; Kim , B.C.; Cho , C.S. "Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications". *Biotechnology.Advances*, 2008, 26, 1–21.
- [45]: Berjer, J.; Reist, M.; Mayer, J.M.; "Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications ". *European. Journal.Pharmaceutics.Biopharmaceutics*. 2004, 57, 19-34.
- [46]: Suyatma, N.E. " Developpement de films biodégradable à base de chitosane, étude du mélange chitosane/PLA, de la plastification et de la compatibilisation" Thèse de doctorat. 2006. Université de Reims. Champagne Ardennes.
- [47]: Islam , M.M.; Masum, S.M.; Molla, M.A.I.; Rahman, M.M.; Shaikh, A.A.; Roy, S.K. " Preparation of Chitosan from Shrimp Shell and Investigation of Its Properties ". *Intenational.Journal of Basic.Applied. Sciences*. 2011 11 (1), 116-130.
- [48]: Dumitriu , S. " Structure-Property relationship in chitosans, Polysaccharides: Structural diversity and functional diversity II ", New York, Marcel Dekker, 2005, 625-642.
- [49]: Aranaz , I.; Mengibar, M.; Harris, R.; Panos , I.; Miralles , B.; Acosta, N.; Galed , G.; Heras , A. " Functional characterization of chitin and chitosan " *Curr.Chem.Biol*, 2009, 3, 203–230.
- [50]: Pengju , L.; Yongqiang , L.; Ru , C.; Xuan , W.; Baoyan , Z. " Studies on graft copolymerization of chitosan with acrylonitrile by the redox system ". *Polymer*, 2009, 50, 5675-5680.
- [51]: Pillai , C.K.S.; Paul , W.; Sharma , C.P. " Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, ". *Progress in Polimer Science*. 2009, 34, 641-678.

- [52]: Zhenzhen , D.; Hanrui , Cui.; Yandong , Wang.; Chunlei ,Wang.; Yan , Li.; Caiqi ,Wang. " Biocompatible AIE material from natural resources: Chitosan and its multifunctional applications".*Carbohydrate.Polymers*.2020 ,Volume 227, 115338.
- [53]: Yadav, A.V.; Bhise , S.B. "Chitosan: A potential biomaterial effective against typhoid". *Current Science*. 2004 vol. 87, 1176-1178.
- [54]: Janek , W.; David, V.; Martin , M.; Benjamin, K.; Ulrich, S.; Susanne , B.; Simona , S. " Characterization of chitosan with different degree of deacetylation and equal viscosity in dissolved and solid state – Insights by various complimentary methods ". *International.Journal.Biological.Macromolecules*. 2021, Volume 171, 242-261.
- [55]: Hardy , D. "Applications of Functionalized Chitosan in Catalysis", *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2005 44, 8499-8520.
- [56]: Krayukhina, M. A.; Samoilova , N. A.; Yamskov , I. A. "Polyelectrolyte complexes of chitosan: formation, properties and applications". *Russian Chemical Reviews*. 2008 , vol. 77, 799-813.
- [57]: Werle, M.; Takeuchi, H.; Bernkop-Schnürch , A. "Modified chitosans for oral drug delivery". *Journal.of Pharmaceutical.Sciences*. 2009, vol. 98, 1643-1656.
- [58]: Abdulhadi Aljawich. "Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques: évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères". Thèse de doctorat. 2013. Université de Lorraine.
- [59]: Elias Assaad. " Carboxyméthyl amidon et son complexe avec du chitosane comme excipients pour des formulations pharmaceutiques". Thèse de Doctorat en biochimie. 2012. Université de Québec à Montréal.
- [60]: Rossi, S.; Ferrari, F.; Bonferoni , M.C.; Caramella , C. "Characterization of chitosan hydrochloride-mucin interaction by means of viscosimetric and turbidimetric measurements". *European.Journal.Pharmaceutical.Sciences*. 2000 , vol. 10, 251-257.
- [61]: Divya, K.; Smitha , V.; Tijith, K.; George.; Jisha , M. S. " Antimicrobial Properties of Chitosan Nanoparticles: Mode of Action and Factors Affecting Activity ". *Fibers and Polymers*. 2017, Vol.18, No.2, 221-230.
- [62]: Chien, P.; Chou, C. " Antifungal activity of chitosan and its application to control postharvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (Citrus tankan hayata) " *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006, (86) ,1964–1969.
- [63]: Qin, Y.; Zhu, C.; Chen, J.; Chen, Y.; Zhang, C. " The absorption and release of silver and zinc ions by chitosan fibers " *J. Appl.Polym. Sci*. 2006 (101) , 766-71.
- [64]: Sophie , N.; Françoise , M.W.; Michael , D.B. " Improved reproducibility in the determination of the molecular weight of chitosan by analytical size exclusion chromatography " *Carbohydrate.Polymers*. 2009 , Volume 75, Issue 3, 528-533.
- [65]: Chen, R. H.; Hwa , H. " Effects of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation with the thermal, mechanical and permeability properties of the prepared membrane". *Carbohydrate.Polymers*. 1996, vol. 29, 353-358.
- [66]: Aider, M.; Brunet, S.; Bazinet, L. "Electroreparation of chitosan oligomers by electro dialysis with ultrafiltration membrane (EDUF) and impact on electro dialytic parameters". *Journal.Membrane.Science*. 2008, vol. 309, 222-232.
- [67]: Sarasam, A.; Madihally, S.V. " Characterization of chitosan–polycaprolactone blends for tissue engineering applications". *Biomaterials*. 2005 , 26, 5500–5508.

- [68]: El Knidri, H.; Belaabed, R.; Addaou, A.; Laajeb, A.; Lahsini, A. "Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan". *International.Journal.Biological.Macromolecules*. 2018, Volume 120, Part A, 1181-1189
- [69]: Caner, C.; Vergano, P.J.; Wiles, J.L. "Chitosan Film Mechanical and Permeation Properties as Affected by Acid, Plasticizer, and Storage". *J. Food Sci.* 2006, 63, 1049-1053.
- [70]: Park, S.Y.; Lee, B.I.; Jung, S.T.; Park, H.J. "Biopolymer composite film based on κ -carrageenan and chitosan". *Material.Research.Bulletin*. 2001, 36, 511-519.
- [71]: Patricia, C.; Manuel, V.; "Mechanical and barrier properties of chitosan combined with other components as food packaging film". *Environmental.Chemistry.Letters*. 2020, 18, 257-267
- [72]: Bousalem Nadjat "Synthèse verte, caractérisation et activité antibactérienne de films composites alginate – nanoparticules d'argent- chitosane". Thèse de Doctorat en chimie. 2017. Université de tlemcen. Algérie
- [73]: Peers, S.; Montebault, A.; Catherine, L. "Chitosan hydrogels for sustained drug delivery". *Journal of Controlled.Release,Elsevier*, 2020, 326, 150-163.
- [74]: Grégorio, C.; Pierre-Marie, B.; Éric, G. "Chitine et chitosane: du biopolymère à l'application". *Livre*, 2009.
- [75]: Carmen, P.; Jiménez, G.; Juan, A.C. "Chitosan : A Natural Biopolymer with a Wide and Varied Range of Applications". *Molecules*. 2020, 25(17), 3981.
- [76]: Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Sudheesh-Kumar, P.T.; Nair, S.V.; Tamura, H. "Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications". *Biotechnology Advances*. 2011, 29, 322-37.
- [77]: Shi, C.; Zhu, Y.; Ran, X.; Wang, M.; Su, Y.; Cheng, T. "Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine". *The Journal of Surgical Research*. 2006, 133, 185-92.
- [78]: Brown, M.A.; Daya, M.R.; Worley, J.A. "Experience with Chitosan Dressings in a Civilian EMS System". *Journal of Emergency.Medicine*. 2009, 37, 1-7.
- [79]: Francesko, A.; Tzanov, T. "Chitin, Chitosan and Derivatives for Wound Healing and Tissue Engineering". *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2010.
- [80]: Coffey, D.G.; Bell, D.A.; Henderson, A.; "Cellulose and Cellulose Derivatives, in Stephen A.M., Food Polysaccharides and their applications, Marcel Dekkerinc, (1995), 123-153, 501-515.
- [81]: Bartouilh L. "Caractérisation et modification de viscocellulose macroporeuse en vue de son utilisation comme matériau de complément osseux". Thèse de doctorat. 2004. Université Bordeaux 1. Ecole doctorale des sciences chimiques.
- [82]: Perez, S.; Mazeau, K. "Conform actions, structures, and morphologies of celluloses in Polysaccharides", (Eds) Severian, D., Marcel Dekker, Inc, New York. 2005, 41-68.
- [83]: Rbii, K. "Formation d'agrégats de hauts poids moléculaires dans la gélatine et comportement en solution aqueuse". Thèse de Doctorat. 2010. Université de Toulouse.
- [84]: Baigl, D. "Etude expérimentale de polyélectrolyte hydrophobe modèle". Thèse de Doctorat. 2003. Université de Paris.
- [85]: Krogars, K.; Heinamaki, J.; Karjalainen, M.; Niskanen, A.; Leskela, M.; Yliruusi, J. "Enhanced stability of rubbery amylose-rich maize starch films plasticized with a combination of sorbitol and glycerol". *International. Journal.pharmacy*. 2003, 251 (1-2), 205-208.

- [86]: Vaz, C. M.; Fossen, M.; Van-Tuil, R. F.; De Graaf, L.A.; Reis, R. L.; Cunha, A.M. "Casein and soybean protein-based thermoplastics and composites as alternative biodegradable polymers for biomedical applications", *Journal.biomedical.materials.research*. 2003 , part A 65 (1), 60-70.
- [87]: Egitto, A.S.; Girardet, J.M.; Miclo, L.; Mollé, D.; Humbert, G.; Gaillard, J.L. "Susceptibility of equine κ - and β -caseins to hydrolysis by chymosin". *International.Dairy.Journal*. 2011 , 11, 885–893.
- [88]: Permyakov, E.A.; Berliner, L.J. "Lactalbumin: Structure and function". *FEBS Letters*, 2000, 269-274.
- [89]: Donald, K.L.; Bo, L.; John, D.F. "Applications for α -lactalbumin in human nutrition". *Nutr Rev*. 2018 , 76(6), 444–460.
- [90]: Wada, Y.; Lonnerdal, B. "Bioactive peptides derived from human milk proteins – mechanisms of action". *J.Nutr.Biochem*. 2014, 25, 503–514.
- [91]: Aurélie Mateos. "Etude protéomique de la microhétérogénéité des caséines α 1 et β équinnes : identification des variants post transcriptionnels et de phosphorylation ; identification des sites phosphorylés de la caséine β ". Thèse de doctorat. 2008. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- [92]: Chrysin, E. D.; Brew, K.; Acharya, K. R. "Crystal structures of apo- and holobovine -lactalbumin at 2.2Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions". *Journal.Biological.Chemistry*.2000, 275, 37021-37029.
- [93]: Elodie Chevalier "Développement et caractérisation de matériaux antimicrobiens extrudés à base de caséines : mise au point d'étiquettes bio-résistantes pour l'optimisation de la traçabilité en fromagerie". Thèse de doctorat. 2017. Université de Lyon. France.
- [94]: Patton S. "Milk: Its remarkable contribution to human health and well-being". New Brunswick, NJ: *Transaction Publishers*. 2004 , 182.
- [95]: De Kruif, C.G.; Huppertz, T.; Urban, V.S.; Petukhov, A.V. "Casein micelles and their internal structure". *Adv Colloid Interface Sci*. 2012 , 171-172 , 36-52.
- [96]: McSweeney, PLH.; Fox, PF. "Advanced Dairy Chemistry". Volume 1A: Proteins: Basic Aspects. 2013.
- [97]: Bylund, G.; Malmgren, B.; Holanowski, A.; "Dairy Processing Handbook" .2015.
- [98]: Ortega-Requena, S.; Rebouillat, S. "Bigger data open innovation: potential applications of value-added products from milk and sustainable valorization of by-products from the dairy industry". *Green Chem*. 2015, 17, 5100-5113.
- [99]: Zhang, N.; Chen, H.; Ma, L.; Zhang, Y. "Physical modifications of polysaccharide from *Inonotus obliquus* and the antioxidant properties". *International.journal.biological.macromolecules*. 2013, 54, 209-215.
- [100]: Jiang, C.; Xiong, Q.; Li, S.; Zhao, X.; Zeng, X. "Structural characterization, sulfation and antitumor activity of a polysaccharide fraction from *Cyclina sinensis*". *Carbohydrate polymers*. 2015 , 115, 200-206.
- [101]: Chen, S.; Zou, Y.; Yan, Z.; Shen, W.; Shi, S.; Zhang, X.; and Wang, H. "Carboxymethylated-bacterial cellulose for copper and lead ion removal". *Journal of Hazardous Materials*, 161(2), (2009). 1355-1359.
- [102]: Kurita, K. "Controlled functionalization of the polysaccharide chitin". *Progress in Polymer Science*. 2001, 26, 1921–1971.
- [103]: Takahashi, H.; Yoshida, T.; Matsumoto, T.; Kameda, Y.; Takano, Y.; Tazo, Y.; and Saegusa, M.; "Frequent β -catenin gene mutations in atypical polypoid adenomyoma of the uterus". *Human pathology*. 2014 , 45(1), 33-40.

- [104]: Silva, D.A.; de Paula, R.C.; Feitosa, J.P.; de Brito, A.C.; Maciel, J.S.; Paula, H.C. "Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide". *Carbohydrate Polymers*. 2004, 58(2), 163-171.
- [105]: Yang, X.H.; and Zhu, W.L. "Viscosity properties of sodium carboxymethylcellulose solutions". *Cellulose*. 2007, 14(5), 409-417.
- [106]: Bousba, S. "Etudes spectrale et microscopique du système gelatine/ carboxymethylcellulose sodique en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et du glucose dans le domaine alimentaire". Thèse de doctorat. 2015. Université de Sétif, Algérie.
- [107]: Fontanille, G. Y. "Chimie et Physico-chimie des Polymères". *Cycles. Ecoles d'Ingénieur*. 2002, 2, 466-473.
- [108]: Fan, L.; Sun, Y.; Xie, W.; Zheng, H.; Liu, S. "Oxidized pectin cross-linked carboxymethyl chitosan: a new class of hydrogels". *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2012, 23(16), 2119-2132.
- [109]: Vignon, M.; Montanari, S.; Samain, D.; Condoret, J.S. "Method for the controlled oxidation of polysaccharides". 2012, *U.S. Patent No. 8, 252,921*.
- [110]: Changxing, J.; Qingping, X.; Songlin, L.; Xirong, Z.; Xiaoxiong, Z. "Structural characterization, sulfation and antitumor activity of apolysaccharide fraction from *Cyclina sinensis*". *Carbohydrate Polymers*. 2015, 115, 200-206.
- [111]: Lishuai, M.; Haixia, C.; Yu Z.; Ning, Z.; Lingling, F. "Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus*". *Carbohydrate Polymers*. 2012, 89(2), 371-378.
- [112]: Cumpstey I. "Review Article Chemical Modification of Polysaccharides". *ISRN Organic Chemistry*. 2013, 1-27.
- [113]: Crini, G.; Badot, P.; Guibal, E. "Chitine et chitosane, du biopolymère à l'application". *Presses universitaires de Franche Comté*. 2007. France, 26.
- [114]: Voragen, F.; Schols, H.; Visser, R. "Advances in Pectin and Pectinase Research". *Kluwer Academic Publishers*. 2003. The Netherlands, 76.
- [115]: Serguschenko, I.; Kolenchenko, E.; Khotimchenko, M. "Low esterified pectin accelerates removal of lead ions in rats". *Nutrition Research*. 2007, 27(10), 633-639.
- [116]: Fox, S.C.; Li, B.; Xu, D.; Edgar, K.J. "Regioselective Esterification and Etherification of Cellulose: A Review". *Biomacromolecules*. 2011, 12(6), 1956-1972.
- [117]: Tang, A.; Zhang, H.; Chen, G.; Xie, G.; Liang W. "Influence of ultrasound treatment on accessibility and regioselective oxidation reactivity of cellulose". *Ultrasonics Sonochemistry*. 2005, 12(6), 467-472.
- [118]: Gosselink, R.J.A.; Dam, J.E.G.; Jong, E.D.; Gellerstedt, G.; Scott, E.L.; Sanders, J.P.M. "Effect of periodate on lignin for wood adhesive application". *Holzforchung*. 2011, 65(2), 155-162.
- [119]: Teotia A. "Modification of carboxymethyl cellulose through oxidation". *Carbohydrate Polymers*. 2012, 87(1), 457-460.
- [120]: Li, H.; Wu, B.; Mu, C.; Lin, W. "Concomitant degradation in periodate oxidation of carboxymethyl cellulose". *Carbohydrate Polymers*. 2011, 84(3), 881-886.
- [121]: Siddhesh, N.P. and Kevin, J.E. "Review Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications". *Journal of Biomaterials*. 2012, 33(11), 3279-3305.
- [122]: Gomez, C.G.; Rinaudo, M.; Villar, M.A. "Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives". *Carbohydrate Polymers*. 2007, 67(3), 296-304.

- [123]: Lewin, M. and Ettinger, A. "Oxidation of cellulose by hydrogen peroxide". *Cellulose Chemistry and Technology*. 1969, 3(1), 9-20.
- [124]: Zeronian, S.H. and Inglesby, M.K. "Bleaching of cellulose by hydrogen peroxide ". *Carbohydrate Polymers*. 1995, 2(4), 265-272.
- [125]: Murinov, K.Y.; Kuramshina, A.R.; Khisamutdinov, R.A.; Murinov, Y.I.; Kabal'nova, N.N. "IR Study on chitosan oxidation with sodium chlorite". *Russian Journal of General Chemistry*. 2010, 80(1), 27-30.
- [126]: Lingbin, L.; Ping, Z.; Yang, C.; Qiang, L.; Sujuan, P.; Huaming, W. "Study on Partially Oxidized Sodium Alginate with Potassium Permanganate as the Oxidant". *Applied Polymer Science*. 2009, 113(6), 3585–3589.
- [127]: Mjahed H. "Caractérisation physico-chimique des films multicouches de polyélectrolytes à base de polysaccharides et de polypeptides en vue d'applications dans le domaine des biomatériaux ". Thèse de Doctorat 2009. Université de Strasbourg.
- [128]: Wichterle, O.; and Lim, D. " Hydrophilic gels for biological use ". *Nature*, 1960, 185, 117-118.
- [129]: Shahid, B.; Maryam, H.; Javed, I.; Rajpar, A.H.; Mujtaba, M.A.; Alghamdi, N.A.; Wageh, S.; Ramesh, K.; and Ramesh, S. " Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications ". *Polymers*. 2020, 12, 2702.
- [130]: Loh, X.J.; Peh, P.; Liao, S.; Sng, C.; and Li, J. "Controlled drug release from biodegradable thermoresponsive physical hydrogel nanofibers ". *Journal of Controlled Release*. 2010, 143,175–182.
- [131]: Bhadani Reena and Mitra Uttam Kumar. " Studies on Water Absorbency of Polyacrylamide Hydrogels ". *Journal of Materials Science and Engineering*. 2015, B 5 (11-12) , 399-405
- [132]: Mantha, S.; Pillai, S.; Khayambashi, P.; Upadhyay, A.; Zhang, Y.; Tao, O.; Pham, H.M.; and Tran, S D. "Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine ". *Materials*. 2019, (Basel). 12(20) , 3323.
- [133]: Rizwan, M.; Yahya, R.; Hassan, A.; Yar, M.; Azzahari, A.D.; Selvanathan, V.; Sonsudin, F.; and Abouloula, C.N. " pH Sensitive Hydrogels in Drug Delivery: Brief History, Properties, Swelling, and Release Mechanism, Material Selection and Applications". *Polymers*. 2017, vol. 9, nr. 137, 1-37.
- [134]: Ghugare, S.V.; et al. "Temperature-Sensitive Poly(vinyl alcohol)/Poly(methacrylate-co-N-isopropyl acrylamide) Microgels for Doxorubicin Delivery ". *Biomacromolecules*. 2009, vol. 10, 1589-1596.
- [135]: Hoare, T.R.; Kohane, D.S. " Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges ". *Polymer*. 2008, vol. 49, 1993-2007.
- [136]: Chaudhuri, O.; Gu, L.; Klumpers, D.; Darnell, M.; Bencherif, S.A.; Weaver, J.C.; Huebsch, N.; Lee, H.P.; Lippens, E.; Duda, G.N.; and Mooney, D.J. " Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity ". *Nat.Mater*. 2016, 15(3), 326–334.
- [137]: Pichayakorn, W.; Suksaeree, J.; Boonme, P.; Amnuait, T.; Taweepreda, W.; Ritthidej, G.C. "Nicotine transdermal patches using polymeric natural rubber as the matrix controlling system: Effect of polymer and plasticizer blends ". *Journal .Membrane.Science*. 2012, 411- 412, 81– 90.
- [138]: Jacob, S.; Nair, A.B.; Shah, J.; Sreeharsha, N.; Gupta, S.; Shinu, P. "Emerging Role of Hydrogels in Drug Delivery Systems, Tissue Engineering and Wound Management". *Pharmaceutics*. 2021, 13, 357.
- [139]: Oh, J.K. *et al.* " The development of microgels/nanogels for drug delivery applications ". *Progress in Polymer. Science*. 2008, vol. 33, 448-477.
- [140]: Yanyu Zhang and Yishun Huang. "Rational Design of Smart Hydrogels for Biomedical Applications ". *Front. Chem*. 2021, 8, 615665.

- [141]: Sharma, S and Tiwari, S. "A review on biomacromolecular hydrogel classification and its applications". *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 162, 737–747.
- [142]: Deligkaris, K.; Tadele, T.S.; Olthuis, W.; van den Berg, A. "Hydrogel-based devices for biomedical applications". *Sens. Actuators B Chem.* 2010, 147 (2), 765–774.
- [143]: Venkatesh, S.; et al "Transport and structural analysis of molecular imprinted hydrogels for controlled drug delivery ". *European.Journal.Pharmaceutics.Biopharmaceutics.* 2008, 69, 852–860.
- [144]: Huang, C.F.; et al "Synthesis and specific interactions of poly(hydroxyethyl methacrylate-b-vinyl pyrrolidone) diblock copolymers and comparisons with their corresponding miscible blend systems". *Polymer.* 2006, 47, 7060-7069.
- [145]: Van Tomme, R.S.; et al "In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications". *International Journal of Pharmaceutics.* 2008, 355, 1–18.
- [146]: Enas M.Ahmed. "Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review ". *Journal of Advanced Research.* 2015, Volume 6, Issue 2, 105-121
- [147]: Morishita, M.; et al "Elucidation of the mechanism of incorporation of insulin in controlled release systems based on complexation polymers ". *Journal of Controlled Release.* 2002, 81, 25–32.
- [148]: Kopecek J. "Hydrogel biomaterials: A smart future? ". *Biomaterials.* 2007, 28, 5185–5192.
- [149]: Page V. "Diffusion de matière dans les gels : application aux systèmes à libération contrôlée ". Thèse de Doctorat en Pharmacie. 2001. Université de Nancy.
- [150]: Patel, A.; Mequanint, K. "Hydrogels Biomaterials. In Reza Fazel, P., editor, Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges. 2011. chapter 14. Intech edition.
- [151]: Hafidh Sehil. "Elaboration de polymères naturels à base de polysaccharides pour application à la libération contrôlée". Thèse de Doctorat en chimie. 2017. Université de sidi belabbes.
- [152]: Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J.M.; Felt, O.; Peppas, N.A.; Gurny, R. "Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications". *European.Journal. Pharmaceutics.Biopharmaceutics.* 2004, 57, 19–34.
- [153]: Guo, B.; Elgsaeter, A.; Stokke, B.T. "Gelation kinetics of scleraldehyde-chitosan co-gels, Polymer Gels and Networks ". 1998, 6, 113-135.
- [154]: Frédéric Vallée. "Synthèse et caractérisation d'un hydrogel d'alginamide pour la régénération de voies nerveuses lésées au sein du Système Nerveux Central chez le rat ". Thèse de Doctorat. 2007. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- [155]: Nilsen-Nygaard, J.; Strand, S.P.; Varum, K.M.; Draget, K.I.; Nordgard, K.T. "Chitosan: Gels and Interfacial Properties ". *Polymers.* 2015, 7, 552-579.
- [156]: Hoffman, A. S. "Hydrogels for biomedical applications". *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002, 54 (1), 3–12.
- [157]: Ebara, M.; Kotsuchibashi, Y.; Uto, K.; Aoyagi, T.; Kim, Y.-J.; Narain, R.; Idota, N.; Hoffman, J. M. "Hydrogels. In *Smart Biomaterials*". NIMS Monographs; Springer Japan. 2014, 9–65.

- [158]: Miquelard-Garnier, G.; Creton, C.; Hourdet, D. "Synthesis and Viscoelastic Properties of Hydrophobically Modified Hydrogels". *Macromolecular.Symposia*. 2007, 256(1), 189-194.
- [159]: Hamidi, M.; Azadi, A.; Rafiei, P. "Hydrogel nanoparticles in drug delivery". *Advanced.Drug.Delivery Reviews*. 2008, 60, 1638–1649.
- [160]: Karakasyan, C. et al. "Cold Gelation of Alginates Induced by Monovalent Cations.Biomacromolecules." 2010, 11(11), 2966-2975.
- [161]: Sophie Talvande. " Les hydrogels associes aux phosphates de calcium dans la regeneration osseuse en parodontologie, Etude de la littérature». Thèse de Doctorat en Chirurgie dentaire. 2015. Université de Nantes.
- [162]: Mi, F.-L.; Kuan, C.-Y.; Shyu, S.-S.; Lee, S.-T.; Chang, S.-F. "The study of gelation kinetics and chain relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release". *Carbohydrate Polymers*. 2000, 41 (4), 389-396.
- [163]: Lu, Y. "Poly (vinyl alcohol)/poly (acrylic acid) hydrogel coatings for improving electrode–neural tissue interface ". *Biomaterials*. 2009, 30, 4143– 4151.
- [164]: Hennink, W.E.; Van Nostrum, C.F. " Novel crosslinking methods to design hydrogels". *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002, 54 (1), 13–36.
- [165]: Ekenseair, A.K.; Boere, K.W.M.; Tzouanas, S.N.; Vo, T.N.; Kasper, F.K.; Mikos, A.G. " Synthesis and Characterization of Thermally and Chemically Gelling Injectable Hydrogels for Tissue Engineering". *Biomacromolecules*. 2012, 13 (6), 1908–1915.
- [166]: Pierog, M.; Gierszewska-Dru_y_ska, M.; Ostrowska-Czubenko, J. " Effect of ionic crosslinking agents on swelling behaviour of chitosan hydrogel membranes ". *Progress on Chemistry and Application of Chitin*, 2009, XIV.
- [167]: Ibezim, E.C.; Andrade, C.T.; Marcia, C.; Barretto, B.; Odimegwu, D.C.; De Lima, F.F. " Ionically Cross-linked Chitosan/Tripolyphosphate Microparticles for the Controlled Delivery of Pyrimethamine, an Antiprotozoal". *Journal.Medicine.Biomedical.Sciences*. 2011, 3, 77-88.
- [168]: Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J.M.; Felt, O.; Gurny, R. " Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications ". *European.Journal.Pharmaceutics. Biopharmaceutics*. 2004, 57 (1), 35-52.
- [169]: Lin, C.C.; Fu, C.H. " Controlled release study of 5-fluorouracil-loaded chitosan/polyethylene glycol microparticles, Drug Deliv ". 2009, 16, 274-279.
- [170]: Csaba, N.; Koping-Hoggard, M.; Alonso, M.J. " Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery ". *International. Journal.Pharmaceutics*. 2009, 382, 205–214.
- [171]: Liu, H.; Gao, C. "Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles". *Polymers. Advanced.Technologies*. 2008, 20, 613–619.
- [172]: Nasefe, M.M.; El-Hefian, E.A.; Saalah, S.; Yahaya, A.H. "Preparation and Properties of Non-Crosslinked and Ionically Crosslinked Chitosan/Agar Blended Hydrogel Films ". *Journal of Chemistry*. 2011, 8, S409-S419.
- [173]: Al-Remawi, M.M.A. " Properties of Chitosan Nanoparticles Formed Using Sulfate Anions as Crosslinking Bridges". *American Journal of Applied Sciences*. 2012, 9, 1091-1100.
- [174]: Daculsi, G.; Uzel, AP.; Weiss, P.; coll. "Developments in injectable multiphasic biomaterials. The performance of microporous biphasic calcium phosphate granules and hydrogels ". *J.Mater.Sci: Mater.Med* 2010, 21(3), 855-61.

- [175]: Rosa, R.; Slaughter, B.V.; Khurshid, S.S.; Fisher, O.Z.; Khademhosseini, A.; Peppas, N.A.; "Hydrogels in Regenerative Medicine". *Adv. Mater.* 2009, 21, 3307–3329.
- [176]: Gaillet, C.; Ducouret, G.; Lafuma, F.; Lauprete, F. "Investigation of the relationships between the chain organization and rheological properties of atactic poly(vinyl alcohol) hydrogels". *Polymer.* 2003, 44, 3375-3380.
- [177]: Bounouira Fouad. "Les gels, aspects théoriques et applications". Thèse de Doctorat en pharmacie. 2015. Université Mohammed V – Rabat.
- [178]: Phadke, A.; Zhang, C.; Arman, B.; Hsu, C.C.; Mashelkar, R.A.; Leled, A.K.; Tauber, M.J.; Aryab, G.; Varghese, S. "Rapid self-healing hydrogels". *PNAS*, 2012, 109, 4383–4388.
- [179]: Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. "Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery". *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2010, 62, 83–99.
- [180]: Wu, S.; Li, H.; Chen, J.P. "Modeling investigation of volume variation kinetics of fast response hydrogels". *Journal of macromolecular science. Part C-Polymer reviews.* 2004, 44, 113–130.
- [181]: Miquelard-Garnier, G. "Synthèse et propriétés mécaniques d'hydrogels polyélectrolytes modifiés par des groupements hydrophobes". Thèse de Doctorat. 2007. l'Université Pierre et Marie Curie.
- [182]: Argüelles-Monal, W.; Goycoolea, F.M.; Peniche, C.; Higuera-Ciajara, I.; "Rheological Study of the Chitosan/glutaraldehyde Chemical Gel System". *Polymer.Gels and Networks.* 1998, 6, 429–440.
- [183]: Ruiz, M.; Sastre, A.M.; Guibal, E. "Palladium Sorption on Glutaraldehyde-crosslinked Chitosan". *React. Funct. Polym.* 2000, 45, 155–173.
- [184]: Coelho, T.C.; Laus, R.R.; Mangrich, A.S.; de Favere, V.T.; Laranjeira, M.C.M.; de Favere, V.T. "Effect of Heparin Coating on Epichlorohydrin Cross-linked Chitosan Microspheres on the Adsorption of Copper (II) Ions". *React. Funct. Polym.* 2007, 67.
- [185]: Sung, H.-W.; Huang, R.-N.; Huang, L.L.H.; Tsai, C.-C.; Chiu, C.-T. "Feasibility Study of a Natural Crosslinking Reagent for Biological Tissue Fixation". *Journal of Biomedical Materials Research.* 1998, 42, 560–567.
- [186]: Cheng, D.; Wu, Y.H.; Guan, Y., *et al.* "Tuning properties of injectable hydrogel scaffold by PEG blending". *Polymer.* 2012, 53 (22), 5124.
- [187]: Shinohara, S.; Kihara, T.; Sakai, S., *et al.*, "Fabrication of in vitro three-dimensional multilayered blood vessel model using human endothelial and smooth muscle cells and high-strength PEG hydrogel". *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2013, 116 (2), 231.
- [188]: Tan, G.X.; Liao, J.W.; Ning, C.Y., *et al.* "Preparation, characterization, and drug-release properties of PEG-DA-based copolymer hydrogel microspheres". *Journal of Applied Polymer Science.* 2012, 125 (5), 3509.
- [189]: Rahman, C.V.; Kuhn, G.; White, L.J., *et al.* "PLGA/PEG-hydrogel composite scaffolds with controllable mechanical properties". *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials.* 2013, 101B (4), 648.
- [190]: Otsuka, H.; Nagamura, M.; Kaneko, A., *et al.* "Chondrocyte spheroids on microfabricated PEG hydrogel surface and their noninvasive functional monitoring". *Science and Technology of Advanced Materials.* 2012, 13 (6).
- [191]: Wang, M.Q.; Yan, J.; Du, S.G., *et al.* "Adsorption characteristic of copper ions and its application in electroless nickel plating on a hydrogel-functionalized poly(vinyl chloride) plastic". *Journal of Materials Science.* 2013, 48 (20), 7224.
- [192]: Zhao, W.; Jin, X.; Cong, Y.; Liu, Y.; Fu, J. "Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering". *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2013, 88 (3), 327–339.

- [193]: Li, Y.; Rodrigues, J.; Tomás, H. "Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications ". *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41 (6), 2193–2221.
- [194] : Spiller, K.L.; Maher, S.A.; Lowman, A.M. "Hydrogels for the Repair of Articular Cartilage Defects" *Tissue Eng. Part B Rev.* 2011 , 17 (4), 281–299.
- [195]: Chai, Q.; Jiao, Y.; Yu, X. "Review Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them". *Gels.* 2017, vol. 3, nr. 6, 2-15.
- [196]: Cho, J.; Heuzey, M.-C.; Bégin, A.; Carreau, P.J. "Viscoelastic properties of chitosan solutions: Effect of concentration and ionic strength ". *Journal .Food.Engineering.* 2006, 74(4), 500-515.
- [197]: Shetye, S.P.; Godbole, A.; Bhilegaokar, S.; Gajare, P. "Hydrogels: Introduction, Preparation, Characterization and Applications ". *International. Journal. Research.Methodology.* 2015, 1(1), 47-72.
- [198]: Gulrez, S.K.H.; Al-Assaf, S.; Phillips, G.O. "Hydrogels: methods of preparation, characterisation and applications, in A. Carpi, Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications". *In.Tech. Publisher*, ISBN 978-953-307-268-5, 2011, 117–150.
- [199]: Sivashanmugam, A.; Arun Kumar, R.; Vishnu Priya, M.; Nair, S. V.; Jayakumar, R. "An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering ". *European Polymer Journal.* 2015, 72, 543-565.
- [200]: Loh, Q.L.; Choong, C. " Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size". *Tissue Eng Part B Rev.* 2013, 19(6), 485-502.
- [201]: Augst, A.D.; Kong, H.J.; Mooney, D.J. " Alginate hydrogels as biomaterials ". *Macromolecular Bioscience,* 2006, 6, 623–633.
- [202]: Van Vlierberghe, S. " Cell-Interactive Biopolymer-based Hydrogels designed for Tissue Engineering ". Thèse de Doctorat. 2010. Ghent University.
- [203]: Willner, I. " Stimuli-Controlled Hydrogels and Their Applications ". *Acc. Chem. Res.* 2017, vol. 50, 657-658.
- [204]: Zhu, X.; PLu, P.; Chen, W.; Dong, J. " Studies of UV crosslinked poly (N-vinylpyrrolidone) hydrogels by FTIR, Raman and solid-state NMR spectroscopies ". *Polymer.* 2010, 51, 3054–3063.
- [205]: Coviello, T.; Matricardi, P.; Marianecchi, C.; Alhaique, F. " Polysaccharide hydrogels for modified release formulations ". *Journal of Controlled Release,* 2007, 119, 5–24.
- [206]: Lack, S.; Dulong, V.; Le Cerf, D.; Picton, L.; Argillier, J.F.; Muller, G. " Hydrogels Based on Pullulan Crosslinked with sodium trimetaphosphate (STMP): Rheological study". *Polymer Bulletin.* 2004, 52, 429–436.
- [207]: Caló, E.; V.Khutoryanskiy, V. " Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products ". *European Polymer Journal.* 2015, Volume 65, 252-267
- [208]: Kuang, J.; Yuk, K.Y.; Huh, K.M. " Polysaccharide-based superporous hydrogels with fast swelling and superabsorbent properties ". *Carbohydrate Polymers.* 2011, 83, 284–290.
- [209]: Devine, D.M.; Devery, S.M.; Lyons, J.G.; Geever, L.M.; Kennedy, J.E.; Higginbotham, C.L. "Multifunctional polyvinylpyrrolidone-polyacrylic acid copolymer hydrogels for biomedical applications ". *International.Journal .Pharmaceutics.* 2006, 326, 50–59.
- [210]: Gulrez, S.K.H.; Al-Assaf, S.; Phillips, G.O. " Hydrogels: methods of preparation, characterisation and applications, in A. Carpi, Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications ". *In.Tech. Publisher.* ISBN 978-953-307-268-5, 2011, 117–150.

- [211]: Lin, C.C.; Metters, A.T " Hydrogels in controlled release formulations : network design and mathematical modeling ". *Advanced drug delivery reviews*. 2006 , 58(12-13) , 1379–408.
- [212]: Lee, E.; Kim, B. " Smart delivery system for cosmetic ingredients using pH-sensitive polymer hydrogel particles". *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2011, 28, 1347–1350.
- [213]: Jean-Pierre Jourdan. " Curcuma et curcumine : de l'histoire aux intérêts thérapeutiques ". Thèse de doctorat en pharmacie. 2015. Université de Caen Normandie.
- [214]: Maheshwari, R.K.; Singh, A.K.; Gaddipati, J.; Srimal Rikhab, C. "Multiple biological activities of curcumin: a short review". *Life Sciences*. 2006, 78 , 2081-2087.
- [215]: Jurenka, J.S. " Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical Research". *Alternative Medicine Review*. 2009, 14(2), 141-153.
- [216]: Gomez-Estaca, J.; Balaguer, M.P.; Gavara, R.; Hernandez-Munoz, P. " Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin". *Food Hydrocoll*. 2012 , 28, 82–91.
- [217]: Vinod, S.T. " Synthesis, caractérisation, application and impurity profiling of curcumin derivatives ". Sos in chemistry Jiwaji university, G Walior (MP).2017.1.
- [218]: Pinheiro, A.C.; Coimbra, M.A.; Vicente, A.A. " In vitro behaviour of curcumin nanoemulsions stabilized by biopolymer emulsifiers – Effect of interfacial composition". *Food Hydrocoll* .2016 , 52, 460–467.
- [219]: Zou, L. et al. " Enhancing the bioaccessibility of hydrophobic bioactive agents using mixed colloidal dispersions: Curcumin-loaded zein nanoparticles plus digestible lipid nanoparticles". *Food. Res. Int*. 2016, 81, 74–82.
- [220]: Kumar, D.D. *et al.* " Formulation and characterization of nanoencapsulated curcumin using sodium caseinate and its incorporation in ice cream ". *Food Funct*. 2016, 7, 417–424.
- [221]: Schneider, C.; Gordon, O.N.; Edwards, R.L.; Luis, P.B. " Degradation of Curcumin: From Mechanism to Biological Implications ". *J. Agric. Food Chem*. 2015, 63, 7606–7614.
- [222]: Sharma, R.A.; Gescher, A.J.; Steward, W.P. " Curcumin: the story so far ". *Eur J Cancer*. 2005; 41,13, 1955-68.
- [223]: Kurien, B.T.; Singh, A.; Matsumoto, H.; Scofield, R.H. " Improving the solubility and pharmacological efficacy of curcumin by heat treatment ". *Assay Drug. Dev. Technol*. 2007, 5, 567–576.
- [224]: Yang, F.; Lim, G. P.; Begum, A.N.; Ubeda, O.J.; Simmons, M.R.; Ambegaokar, S.S.; Chen, P.; Kaye, R.; Glabe, C.G.; Frautschi, S.A.; Cole, G.M. "Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo ". *J. Biol. Chem*. 2005, 280(7), 5892–5901.
- [225]: Goel, A.; Kunnumakkara, A.B.; Aggarwal, B.B. "Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic " *Biochem. Pharmacol*. 2008, 75, 787–809.
- [226]: Arrieta, A.; Dietze, F.; Mann, G.; Beyer, L.; Hartung, J. "Acidity and Complex Formation of Curcuminoids ". *J. Prakt. Chem*. 1988, 330, 111–118.
- [227]: Ravindran, P.N.; Nirmal, B.K.; Sivaraman, K. " Medicinal and Aromatic Plants–Industrial Profiles: Turmeric: The Genus *Curcuma* ". *CRC Press, Washintogton*, 2007, 484.
- [228]: Anand, P.; Kunnumakkara, A.B.; Newman, R.A.; Aggarwal, B.B. "Bioavailability of curcumin: problems and promises ". *Mol. Pharm*. 2007, 4, 807–818.

- [229]: Lao, C.D.; Ruffin, M.T.; Normolle, D.; Heath, D.D.; Murray, S.I.; Bailey, J.M.; Boggs, M.E.; Crowell, J.; Rock, C.L.; Brenner, D.E. "Dose Escalation of a Curcuminoid Formulation". *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2006, 6 (10), 1–4.
- [230]: Hatcher, H.; Planalp, R.; Cho, J.; Torti, F.M.; Torti, S.V. "Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials". *Cell. Mol. Life. Sci.* 2008, 65,1631–52.
- [231]: Tamvakopoulos, C.; Sofianos, Z.D.; Garbis, S.D.; Pantazis, P. "Analysis of the in vitro metabolites of diferuloylmethane (curcumin) by liquid chromatography--tandem mass spectrometry on a hybrid quadrupole linear ion trap system: newly identified metabolites". *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* 2007, 32, 51–57.
- [232]: Zakaria Cheikh Ali. "Études chimiques et biologiques d'Aframomum sceptrum (Zingiberaceae) et de la curcumine". Thèse de doctorat. 2012. Université Paris-Sud. France.
- [233]: Kim, JE.; Chang, HY.; Han, SY.; Kim, BS.; Choi, JS. "In Vitro peroxy nitrite scavenging activity of diarylheptanoids from curcuma longa". *Phytother Res.* 2003, 17(5), 481-4.
- [234]: Iqbal, M.; Sharma, S.D.; Okazaki, Y.; Fujisawa, M.; Okada, S. "Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase metabolizing enzymes in ddy male mice : possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity". *Pharmacol.Toxicol.* 2003, 92(1), 8-33.
- [235]: Chattopadhyay, J.; Biswas, K.; Bandyopadhyay, U.; Banerjee, R.K. "Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications". *Curr. Sci.* 2004, 87, 44–53.
- [236]: Bernard, M.; Couderc, R.; Cynober, L. "Les aliments traditionnels: Remèdes de bonne femme Ou pharmacopée du xxiè siècle l'exemple de la curcumine". *Cah. Nutr. Diét.* 2005, 40 (6), 325-333.
- [237]: Salh, B.; Assi, K.; Templeman, V.; Parhar, K.; Owen, D.; Gomezmunoz, A.; Jacobson, K. "Curcumin attenuates DNB-induced murine colitis". *J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 2003, 285 (1), 235-43.
- [238]: Christelle, H. "Le curcuma, de l'épice au médicament". Thèse de doctorat en pharmacie. 2010. Université Henri Poincaré, Nancy 1, France.
- [239]: Arun, N.; Nalini, N. "Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats". *Plant.Foods for Human Nutri.* 2002, 57, 41-52.
- [240]: Lekshmi, PC.; Arimboor, R.; Indulekha, PS.; Menon, AN. "Turmeric (Curcuma longa L.) Volatile oil inhibits key enzymes linked to type 2 diabetes". *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 2012, 63(7), 832-834.
- [241]: Yadav, V.R.; Suresh, S.; Devi, K.; Yadav, S.; "Effect of cyclodextrin complexation of curcumin on its solubility and antiangiogenic and anti-inflammatory activity in rat colitis model". *AAPS.Pharm.Sci.Tech.* 2009 10(3), 752-762.
- [242]: Wüpper, S.; Lüersen, K.; Rimbach, G. "Cyclodextrins, Natural Compounds, and Plant Bioactives—A Nutritional Perspective". *Biomolecules.* 2021, 11, 401.
- [243]: Cravotto, G.B.; inello, A.; Baranelli, E.; Carraro, P.; Trotta, F.; "Cyclodextrins as Food Additives and in Food Processing". *Curr. Nutr. Food Sci.* 2006, 2, 343–350.
- [244]: Boltman, T. "Liposomal drug delivery to brain cancer cells". 2015.
- [245]: Simone Braga Carneiro et al. "Cyclodextrin–Drug Inclusion Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches". *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(3), 642.
- [246]: Decottignies, A. "Catalyse dans l'eau en présence de cyclodextrine native ou modifiée: Application au couplage croisé de type Suzuki". Thèse de doctorat. 2013. Université de Technologie de Compiègne.

- [247]: Ciobanu, A. *et al.* "Inclusion interactions of cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers with linalool and camphor in *Lavandula angustifolia* essential oil". *Carbohydr. Polym.* 2012, 87, 1963–1970.
- [248]: Ciobanu, A. *et al.* "Retention of aroma compounds from *Mentha piperita* essential oil by cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers". *Food Chem.* 2013, 138, 291–297.
- [249]: Djedaini-Pilard, F. "Enhancement of vitamin A skin absorption by cyclodextrins". *J. Drug Del. Sci. Tech.* 2004, 77–86.
- [250]: Kumar, R.; Kaur, K.; Uppal, S.; Mehta, S.K. "Ultrasound processed nanoemulsion: A comparative approach between resveratrol and resveratrol cyclodextrin inclusion complex to study its binding interactions, antioxidant activity and UV light stability". *Ultrason. Sonochem.* 2017, 37, 478–489.
- [251]: Mercader-Ros, M. T.; Lucas-Abellán, C.; Fortea, M.I.; Gabaldón, J.A.; Núñez-Delicado. "E. Effect of HP- β -cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols". *Food Chem.* 2010, 118, 769–773.
- [252]: Tønnesen, H. H.; Másson, M.; Loftsson, T. "Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability". *Int. J. Pharm.* 2002, 244, 127–135.
- [253]: Chirio, D. *et al.* "Influence of α - and γ - cyclodextrin lipophilic derivatives on curcuminloaded SLN". *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2009, 65, 391–402.
- [254]: Davis, M.E.; Brewster, M.E. "Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future". *Nature Reviews Drug Discovery.* 2004, 3(12), 1023-1035.
- [255]: Maderuelo, C.; Zarzuelo, A.; Lanao, J.M. "Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices". *Journal. Controlled. Release.* 2011, vol. 154, 2-19.
- [256]: Kamaly, N.; Yameen, B.; Wu, J.; Farokhzad, O.C. "Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release". *Chem Rev.* 2016, 116(4), 2602–2663.
- [257]: Jantzen, G.W.; Robinson, J.R.; "In: Sustained- and Controlled-Release Drug- Delivery Systems, Drugs and Pharmaceutical Sciences; Modern Pharmaceuticals", Ed. G.S. Banker; C.T. Rhodes; Marcel Dekker; New York; 2002, 501-528.
- [258]: Kulikowska, A.; Wasiak, I.; Ciach, T. "Carboxymethyl Cellulose Oxidation to Form Aldehyde Groups". *Biomed. Eng.* 2013, 4, 11-18.
- [259]: Li, H.; Wu, B.; Mu, C.; Lin, W.; "Concomitant degradation in periodate oxidation of carboxymethyl cellulose". *Carbohydrate Polymers.* 2011, 84(3), 881-886.
- [260]: McSweeney, J. D.; Rowell, R.M.; Chen, G. C.; Eberhardt, T. L.; Min, S.-H. "Periodate and hypobromite modification of southern pine wood to improve sorption of copper ion". *Bioresources.* 2008, 3, 204–216.
- [261]: Dean, J.A. Lange's "handbook of chemistry". 15th edition. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, Toronto, London, 1999, 1292.
- [262]: Kasapoglu-Calik, M.; Ozdemir, M. "Synthesis and controlled release of curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex from nanocomposite poly (N -isopropylacrylamide/sodium alginate) hydrogels". *J. Appl. Polym. Sci.* 2019.
- [263]: Lowry, O.H.; Rosebrough, N. J.; Randall, R. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265.

- [264]: Ma, D.H-K.; Lai, J.Y.; Cheng, H.Y.; Tsai, C.C.; Yeh, L.K. "Carbodiimide cross-linked amniotic membranes for cultivation of limbal epithelial cells ". *Biomaterials*. 2010, Volume 31, Issue 25, 6647-6658.
- [265]: Kiti, K.; Suwantong, O. " Bilayer wound dressing based on sodium alginate incorporated with curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex/chitosan hydrogel ". *International.Journal.Biological.Macromolecules*. 2020 , Volume 164, 4113-4124.
- [266]: Lihong, F.; Yi, S.; Weigu, X.; Hua, Z.; Shuhua, L. " Oxidized pectin cross-linked carboxymethyl chitosan: a new class of hydrogels ". *Journal.Biomaterials.Science.Polymer.Edition*. 2012 , 23(16), 2119–2132.
- [267]: Bourbon, A.I.; Cerqueira, M.A.; Vicente, A.A. " Encapsulation and controlled release of bioactive compounds in lactoferrin-glycomacropeptide nanohydrogels: curcumin and caffeine as model compounds ". *Journal.Food.Engineering*. 2016, Volume 180, 110-119.
- [268]: Ritger, P.L.; Peppas, N.A. " A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs ". *J. Control. Release*. 1987, vol. 5, 23-36.
- [269]: Suresh, D.K.; Yogesh, S.C.; Priyanka, B.; Preetesh, M.; Khusbu S.; Pallavi, D. "Degradation studies of curcumin". *International.Journal.Pharmacy.Review.Research*. 2013 , Vol 3, Issue 2 , 50-55.
- [270]: Ibrahima DIALLO "Potentiels anti-oxydants et anti-inflammatoires de sporophores de *Lentinula edodes* (Shiitake) sous différentes conditions de culture ". Thèse de Doctorat. 2019. Université de Montpellier, France.
- [271]: Choi, C.W.; Kim, S.C.; Hwang, S.S.; Choi, B.K.; Ahn, H.J.; Lee, M.Y.; Park, S.H.; Kim, S.K. "Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison» *Plant Sci.*, 163, **2002** , 1161–1168.
- [272]: Hosoya, T.; Bacher, M.; Potthast, A.; Elder, T.; Rosenau, T. "Insights into degradation pathways of oxidized anhydroglucose units in cellulose by β -alkoxy-elimination: a combined theoretical and experimental approach ". *Cellulose*. 2018, 25, 3797–3814.
- [273]: Mansouri, L.; Benghanem, S.; Elkolli, M.; Mahmoud, B. " Chemical and biological behaviors of hydrogels based on oxidized carboxymethylcellulose coupled to chitosan ". *Polym. Bull*. **2019**, 77, 85–105.
- [274]: Lan,W.; He, L.; Liu, Y. "Preparation and Properties of Sodium Carboxymethyl Cellulose/Sodium Alginate/Chitosan Composite Film ". *Coatings*. **2018**, 8, 291.
- [275]: Peng, Y.; Liu, R.; Cao, J. " Characterization of surface chemistry and crystallization behavior of polypropylene composites reinforced with wood flour, cellulose, and lignin during accelerated weathering ". *Appl. Surf. Sci*. **2015**, 332, 253–259.
- [276]: Nandiyanto, A.B.D.; Oktiani, R.; Ragadhita, R. " How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material ". *Indones. J. Sci. Technol*. **2019**, 4, 97–118.
- [277]: Venkateshwarlu, G.; Subrahmanyam, B. " Conformations of unsaturated ketones: An IR spectroscopic study ". *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)* **1990**, 102, 45–50.
- [278]: Afinjuomo, F.; Fouladian, P.; Barclay, T.G.; Song, Y.; Petrovsky, N.; Garg, S. " Influence of Oxidation Degree on the Physicochemical Properties of Oxidized Inulin ". *Polymers*. **2020**, 12, 1025.
- [279]: Lisman, A.; Butruk, B.; Wasiak, I.; Ciach, T. " Dextran/Albumin hydrogel sealant for Dacron(R) vascular prosthesis ". *J. Biomater. Appl*. **2014**, 28, 1386–1396.
- [280]: Dou, Y.; Zhang, L.; Zhang, B.; He, M.; Shi,W.; Yang, S.; Cui, Y.; Yin, G. " Preparation and Characterization of Edible Dialdehyde Carboxymethyl Cellulose Crosslinked Feather Keratin Films for Food Packaging ". *Polymers*. **2020**, 12, 158.

- [281]: Dacrory, S.; Abou-Yousef, H.; Kamel, S.; Abou-Zeid, R.E.; Abdel-Aziz, M.S.; ElBadry, M. "Functionalization and cross-linking of carboxymethyl cellulose in aqueous media". *Cellul. Chem. Technol.* **2019**, 53, 23–33.
- [282]: Dyatlov, V.; Gumnikova, V.; Grebeneva, T.; Kruppa, I.; Rustamov, I.; Kireev, V.; Maleev, V. "Study of the Chemical Structure of Dialdehyde Carboxymethyl Cellulose Produced by Periodate Oxidation under Different Conditions". *Int. Polym. Sci. Technol.* **2015**, 42, 19–26.
- [283]: Gu, H.; He, J.; Huang, Y.; Guo, Z. "Fabrication of oxidized sodium carboxymethylcellulose from viscose fibers and their viscosity behaviors Fibers" *Polym.* **2013**, 14, 1266–1270.
- [284]: Kono, H.; Oshima, K.; Hashimoto, H.; Shimizu, Y.; Tajima, K. "NMR characterization of sodium carboxymethyl cellulose: Substituent distribution and mole fraction of monomers in the polymer chains" *Carbohydr. Polym.* **2016**, 146, 1–9.
- [285]: Krausz P.; Benhaddou R.; Granet R. "Mini manuel de chimie organique", *Dunod*, Paris, 2008, 64.
- [286]: Le Roux J. "Modification des fibres cellulosiques amelioration des proprietes hydrophiles des pates bisulfites".Thèse de Doctorat. 2003. Université bordeaux I. France.
- [287]: Chetouani, A.b.; Elkolli, M.; Bounekhel, M.; Benachour, D. "Synthesis and properties of novel hydrogels from oxidized pectin crosslinked gelatin for biomedical applications". *Polymer Bulletin.* **2014**, 71(9), 2303–2316.
- [288]: Patrulea, V.; Ostafe, V.; Borchard, G.; Jordan, O. "Chitosan as a starting material for wound healing applications ". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, 97, 417–426.
- [289]: Hou, Q.X.; Liu,W.; Liu, Z.H.; Bai, L.L. " Characteristics of Wood Cellulose Fibers Treated with Periodate and Bisulfite ". *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, 46, 7830–7837.
- [290]: Ereemeev, T.E.; Bykova, T.O. " SEC of mono-carboxymethyl cellulose (CMC) in a wide range of pH; Mark–Houwink constants." *Carbohydr. Polym.* 1998, 36, 319–326.
- [291]: Lee, S.H. " Preparation and Evaluation of Crosslinked Polyelectrolyte Complex Membranes " *Polym. J.* **2000**, 32, 716–721.
- [292]: Fukuda, H.; Kikuchi, Y. "Polyelectrolyte Complexes of Sodium Carboxymethylcellulose with Chitosan ". *Makromol. Chem.* **1979**, 180,1631–1633.
- [293]: Strätz, J.; Liedmann, A.; Trutschel, M.-L.; Mäder, K.; Groth, T.; Fischer, S. " Development of hydrogels based on oxidized cellulose sulfates and carboxymethyl chitosan ". *Cellulose.* **2019**, 26, 7371–7382.
- [294]: Lü, S.; Liu, M.; Ni, B. " An injectable oxidized carboxymethylcellulose/N-succinyl-chitosan hydrogel system for protein delivery ". *Chem. Eng. J.* **2010**, 160, 779–787.
- [295]: Al-Sagheer, F. A.; Ibrahim, E. I.; Khalil, K. D. " Crystallinity, antimicrobial activity and dyeing properties of chitosan-g-poly (N-acryloyl morpholine) copolymer ". *European.Polymer.Journal.* 2014 , 58, 164-172.
- [296]: Tian, F.; Liu, Y.; Hu, K.; Zhao, B. " Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide ". *Carbohydr. Polym.* 2004, 57, 31–37.
- [297]: Dou, Y.; Zhang, L.; Zhang, B.; He, M.; Shi,W.; Yang, S.; Cui, Y.; Yin, G. " Preparation and Characterization of Edible Dialdehyde Carboxymethyl Cellulose Crosslinked Feather Keratin Films for Food Packaging". *Polymers* **2020**, 12, 158.
- [298]: Marin, L.; Harabagiu, V.; Van Der Lee, A.; Arvinte, A.; Barboiu, M. " Structure-directed functional properties of symmetrical and unsymmetrical Br-substituted Schiff-bases ". *J. Mol. Struct.* **2013**, 1049, 377–385.

- [299]: Cheaburu-Yilmaz, C.N.; Dumitriu, R.P.; Nistor, M.-T.; Lupusoru, C.; Popa, M.I.; Profire, L.; Vasile, C. "Biocompatible and Biodegradable Chitosan/Clay Nanocomposites as New Carriers for Theophylline Controlled Release." *Br. J. Pharm. Res.* **2015**, *6*, 228–254.
- [300]: Dovbeshko, G.I.; Gridina, N.Y.; Kruglova, E.B.; Pashchuk, O.P. "FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage". *Talanta.* **2000**, *53*, 233–246.
- [301]: Fukuda, H. "Polyelectrolyte complexes of chitosan with sodium carboxymethylcellulose". *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1980**, *53*, 837–840.
- [302]: Benghanem, S.; Chetouani, A.; Elkolli, M.; Bounekhel, M.; Benachour, D. "Grafting of oxidized carboxymethyl cellulose with hydrogen peroxide in presence of Cu(II) to chitosan and biological elucidation". *Biocybern.Biomed.Eng.* **2017**, *37*, 194-102.
- [303]: Iurciuc-Tincu, C.E.; Atanase, L.I.; Ochiuz, L.; Jérôme, C.; Sole, V.; Martin, P.; Popa, M. "Curcumin-loaded polysaccharides-based complex particles obtained by polyelectrolyte complexation and ionic gelation, I-Particles obtaining and characterization". *Int. J. Biol. Macromol* **2020**, *147*, 629-642.
- [304]: Zielinska, A.; Alves, H.; Marques, V.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Alves, T.F.; Morsink, M.; Willems, N.; Eder, P.; Chaud, M.V.; Severino, P.; Santini, A.; Souto, E.B. "Properties, Extraction Methods, and Delivery Systems for Curcumin as a Natural Source of Beneficial Health Effects". *Medicina.* **2020**, *56*, 336.
- [305]: Wang, Q.Z.; Chen, X.G.; Liu, N.; Wang, S.X.; Liu, C.S.; Meng, X.H.; Liu, C.G. "Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation". *Carbohydrate Polymers.* **2006**, *65*, 194-201.
- [306]: Szymańska, E.; Winnicka, K. "Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications". *Mar. Drugs.* **2015**, *13*, 1819-1846.
- [307]: Agrawal, R.; Sandhu, S.K.; Sharma, I.; Kaur, I.P. "Development and evaluation of curcumin-loaded elastic vesicles as an effective topical anti-inflammatory formulation." *AAPS Pharm Sci Tech.* **2015**, *16*, 364-74.
- [308]: Ternullo, S.; Schulte Werning, L.V.; Holsæter, A.M.; Škalko-Basnet, N. "Curcumin-In-Deformable Liposomes-In-Chitosan-Hydrogel as a Novel Wound Dressing". *Pharmaceutics.* **2019**, *12*, 8.
- [309]: Elboutachfai, R.; Petit, E.; Pillon, M.; Courtois, B.; Courtois, J.; Delattre, C. "Evaluation of antioxidant capacity of ulvan-like polymer obtained by regioselective oxidation of gellan exopolysaccharide". *Food Chemistry*, **2011**, Pages 976-983
- [310]: Renyi, Y.; Yangyang, C.; Bin, Y. "HPLC-DPPH Screening Method for Evaluation of Antioxidant Compounds Extracted from Semen Oroxyli". *Molecules.* **2014**, *19*, 4409-4417.
- [311]: Mansouri, L.; Benghanem, S.; Elkolli, M.; Bounekhel, M.; "Chemical and biological behaviours of hydrogels based on oxidized carboxymethylcellulose coupled to chitosan". *Polymer Bulletin.* **2019**, *77*, 85–105.
- [312]: Anjali, T.; Saiqa, I.; Bhuvanesh, G.; "Structural characterization of chitosan and oxidized carboxymethyl cellulose based freeze-dried films". *Polym. Bull.* **2012**, *69*, 175–188.
- [313]: Priyanka, A.; Neera, R.. "In-vitro studies of Curcumin-β-cyclodextrin inclusion complex as sustained release system". *Journal of Molecular Structure*. **2021**, Volume 1228, 129774.
- [314]: Bingjing, Z.; David, J. "Formulation of More Efficacious Curcumin Delivery Systems Using Colloid Science: Enhanced Solubility, Stability, and Bioavailability". *J. Molecules.* **2020**, *25*(12), 2791.
- [315]: Lee, W.-H.; Loo, C.-Y.; Bebawy, M.; Luk, F.; Mason, R.S.; Rohanizadeh, R. "Curcumin and its Derivatives: Their Application in Neuropharmacology and Neuroscience in the 21st Century". *Current Neuropharmacology.* **2013**, *11*(4), 338–378.

[316]: Iurciuc (Tincu), C-E.; Atanase Ionuț, L.; Jérôme, C.; Sol, V.; Martin, P.; Popa, M.; Ochiuz, L.; "Polysaccharides-Based Complex Particles' Protective Role on the Stability and Bioactivity of Immobilized Curcumin". *Int. J. Mol .Sci.* 2021 , 22(6), 3075.

[317]: Schneider, C.; Gordon, O. N.; Edwards, R. L.; Luis, P.B. "Degradation of curcumin: From mechanism to biological implications". *Journal.Agricultural.Food.Chemistry.* 2015 , 63(35), 7606–7614.

[318]: Griesser, M.; Pistis, V.; Suzuki, T.; Tejera, N.; Pratt, DA.; Schneider, C. "Autoxidative and cyclooxygenase-2 catalyzed transformation of the dietary chemopreventive agent curcumin". *J. Biol. Chem.* 2011, 286 , 1114–24.