



HAL
open science

Les alginates, excipients d'origine marine utilisés dans l'industrie pharmaceutique: applications à la synthèse d'un gel chimique

Isabelle Goujon

► **To cite this version:**

Isabelle Goujon. Les alginates, excipients d'origine marine utilisés dans l'industrie pharmaceutique: applications à la synthèse d'un gel chimique. Sciences pharmaceutiques. 2004. hal-01732836

HAL Id: hal-01732836

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732836>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

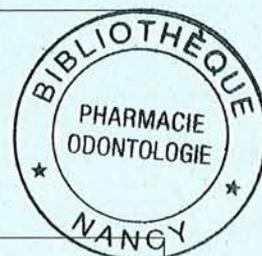
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Faculté de Pharmacie



Les Alginates : excipients d'origine marine utilisés dans l'industrie pharmaceutique

Application à la synthèse d'un gel chimique

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 21 Juin 2004
par

Isabelle GOUJON
Née le 8 Juillet 1979 à Nancy

Pour obtenir
Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

DB 20356

Membres du jury :

Président : M. Philippe MAINCENT, Professeur
Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie de NANCY

Directeur : M. Eric FAVRE, Professeur
Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, E.N.S.I.C NANCY

Juge : M. Alf LAMPRECHT, Maître de Conférences
Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie de NANCY

BU PHARMA-ODONTOL



104 067164 4



Université Henri Poincaré – Nancy I
2004



Faculté de Pharmacie

Les Alginates : excipients d'origine marine utilisés dans l'industrie pharmaceutique

-

Application à la synthèse d'un gel chimique

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 21 Juin 2004
par

Isabelle GOUJON
Née le 8 Juillet 1979 à Nancy

Pour obtenir
Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

DB 30356

Membres du jury :

Président : M. Philippe MAINCENT, Professeur
Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie de NANCY

Directeur : M. Eric FAVRE, Professeur
Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, E.N.S.I.C NANCY

Juge : M. Alf LAMPRECHT, Maître de Conférences
Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie de NANCY

Membres du personnel enseignant 2003/2004

Doyen

Chantal FINANCE

Vice Doyen

Anne ROVEL

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Responsable de la Filière officine

Gérald CATAU

Responsable de la Filière industrie

Jeffrey ATKINSON

**DOYEN HONORAIRE**

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS EMERITES

M. BONALY Roger

M. HOFFMAN Maurice

PROFESSEURS HONORAIRES

Mlle BESSON Suzanne

Mlle GIRARD Thérèse

M. JACQUE Michel

M. LECTARD Pierre

M. LOPPINET Vincent

M. MARTIN Jean-Armand

M. MIRJOLET Marcel

M. PIERFITTE Maurice

M. SCHWARTZBROD Louis

PROFESSEURS

M. ASTIER Alain

M. ATKINSON Jeffrey

M. AULAGNER Gilles

M. BAGREL Alain

Mlle BATT Anne-Marie

M. BLOCK Jean-Claude

Mme CAPDEVILLE-ATKINSON Christine

Mme FINANCE Chantal

Mme FRIANT-MICHEL Pascale

Mlle GALTEAU Marie-Madeleine

M. HENRY Max

M. LABRUDE Pierre

M. LALLOZ Lucien

M. LEROY Pierre

M. MAINCENT Philippe

M. MARSURA Alain

M. MORTIER François

M. NICOLAS Alain

M. REGNOUF de VAINS Jean-Bernard

M. RIHN Bertrand (Professeur associé)

Mme SCHWARTZBROD Janine

M. SIEST Gérard

M. SIMON Jean-Michel

M. VIGNERON Claude

Pharmacie clinique

Pharmacologie cardiovasculaire

Pharmacie clinique

Biochimie

Toxicologie

Santé publique

Pharmacologie cardiovasculaire

Bactériologie -Immunologie

Mathématiques, physique, audioprothèse

Biochimie clinique

Botanique, mycologie

Physiologie, orthopédie, maintien à domicile

Chimie organique

Chimie physique générale

Pharmacie galénique

Chimie thérapeutique

Pharmacognosie

Chimie analytique

Chimie Thérapeutique

Biochimie

Bactériologie, parasitologie

Biologie, pharmacologie moléculaire

Droit officinal, législation pharmaceutique

Hématologie, physiologie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme GRISON Geneviève

Pratique officinale

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - virologie
Mme	BANAS Sandrine	Parasitologie
M.	BOISBRUN Michel	Chimie Thérapeutique
Mme	BOITEUX Catherine	Biophysique, Audioprothèse
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacologie
M.	CHEVIN Jean-Claude	Chimie générale et minérale
M.	CHILLON Jean-Marc	Pharmacologie
M	CLAROT Igor	Chimie analytique
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie, conseils vétérinaires
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Mme	FAIVRE-FIORINA Béatrice	Hématologie
M.	FERRARI Luc	Toxicologie
Mie	FONS Françoise	Biologie végétale, mycologie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie clinique
Mie	HINZELIN Françoise	Mycologie, botanique
M.	HUMBERT Thierry	Chimie organique
M.	JORAND Frédéric	Santé, environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mie	LAMBERT Alexandrine	Biophysique, biomathématiques
M.	LAMPRECHT Alf	Pharmacie galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LIVERTOUX Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Communication et santé
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MONAL Jean-Louis	Chimie thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDIAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	ROVEL Anne	Histologie, physiologie
Mme	SAUDER Marie-Paule	Mycologie, botanique
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria-Monika	Biochimie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR AGREGE

M. COCHAUD Christophe

Anglais

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Mycologie
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie, phytothérapie
Mme	PAVIS Annie	Bactériologie

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI
IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR
AUTEUR ».

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

REMERCIEMENTS

A mes juges,

M. le **Professeur Philippe Maincent** dont j'ai pu apprécier les cours de pharmacie galénique au cours de mes études et qui me fait l'honneur de présider ce jury. Trouvez ici l'expression de ma sincère gratitude.

M. le **Professeur Eric Favre** qui me fait l'honneur d'encadrer les travaux de recherche de cette thèse. Pour votre accueil et votre bonne humeur, je tiens à vous adresser mes plus sincères remerciements.

M. le **Docteur Alf Lamprecht** qui me fait l'honneur de juger de ce travail aujourd'hui. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

Mme le **Docteur Michelle Léonard** pour vos conseils éclairés lors de mes travaux de recherche. Je vous adresse ici ma profonde reconnaissance.

A mes parents,

Un énorme Merci à vous qui avez toujours été là pour me soutenir lors de ces 7 années d'études.

Ce travail est aussi un peu le vôtre, symbole de ma gratitude et de mon amour.

A mon frère Emmanuel et à Nathalie,

Merci pour votre présence à mes côtés, pour vos conseils éclairés, pour votre soutien logistique et orthographique.

A Arnaud,

Je t'adresse du fond du cœur un tendre merci pour ton soutien de chaque jour.

A mes amis,

Anne, Anne-Claire, Anne-Sophie, Céline, Delphine, Guillaume, Laurent, Manu, Matthieu, Nathalie, Silvia, Sylvie et Valéry

Et à ceux que j'oublie ici avec qui j'ai eu la chance de faire un bout de chemin,

A mes camarades de la filière Pharma Plus,

Aline, Audrey, Christine, Julie, Fouad, Mickaël, Morad, Nicolas et Samd

A mes tendres filleuls, Corentin et Maëlle à qui je dédie ce travail.

SOMMAIRE



INTRODUCTION	1
<u>PARTIE 1 : GENERALITES SUR LES ALGINATES</u>	4
1. IDENTITE DES ALGINATES	5
1.1. HISTORIQUE	5
1.2. ELEMENTS DE BIOCHIMIE	5
1.2.1. Nature chimique	5
1.2.2. Principales caractéristiques	9
1.2.3. Diversité	10
2. LES ALGUES SOURCES D'ALGINATES	12
2.1. GENERALITES SUR LES ALGUES	12
2.2. LES PHEOPHYCEES SOURCES D'ALGINATES	14
2.2.1. Principales espèces exploitées	16
2.2.2. Localisation des principaux alginophytes	24
2.2.3. Localisation des alginates dans les algues	24
2.2.4. Variabilité des alginates	26
3. LES ALGINATES D'ORIGINE BACTERIENNE	28
<u>PARTIE 2 : DE LA RECOLTE A L'EXTRACTION INDUSTRIELLE</u>	29
1. MODALITES DE RECOLTE DES ALGINOPHYTES	30
2. EXTRACTION INDUSTRIELLE DE L'ACIDE ALGINIQUE	32
2.1. OPERATIONS COMMUNES AUX DEUX PROCEDES	34
2.1.1. Préparation de la matière végétale	34
2.1.2. Formation de l'alginate de sodium	34
2.1.3. Isolation de la phase liquide	36
2.2. OPERATIONS SPECIFIQUES A CHAQUE PROCEDE	37
2.2.1. Méthode indirecte : précipitation par le chlorure de calcium	37
2.2.2. Méthode directe : précipitation acide	39
3. L'INDUSTRIE DES ALGINATES	43
3.1. LES PRINCIPALES USINES	43
3.2. CARACTERISITIQUES DES EQUIPEMENTS D'EXTRACTION	43
4. LE MARCHÉ MONDIAL DES ALGINATES	45
4.1. DE L'ARTISANAT A L'INDUSTRIE	45
4.2. QUELQUES CHIFFRES SUR LA PRODUCTION	46
4.3. LES DIFFERENTS TYPES D'ALGINATES COMMERCIALISES	50

<u>PARTIE 3 : GELS ET SOLUTIONS COLLOÏDALES D'ALGINATE</u>	51
1. PROPRIETES GELIFIANTES ET VISCOSIFIANTES DES ALGINATES	52
1.1. NOTION DE GEL	52
1.2. THEORIE DE LA "EGG-BOX"	53
1.3. SOLUTIONS COLLOÏDALES	56
1.3.1. Transition sol-gel	57
1.3.2. Pouvoir gélifiant des alginates	58
1.4. TECHNIQUES DE GELIFICATION	59
1.4.1. Variabilité des gels obtenus	60
2. PROPRIETES DES GELS D' ALGINATES	62
2.1. SOLUBILITE	62
2.2. VISCOSITE	63
2.3. STABILITE	64
2.3.1. Stabilité des alginates	64
2.3.2. Stabilité des solutions et gels	65
2.4. GONFLEMENT	68
3. CONCLUSION	69
<u>PARTIE 4 : LES ALGINATES EXCIPIENTS</u>	71
1. LES ALGINATES : UN PRODUIT OFFICINAL	72
1.1. DENOMINATIONS ET REFERENTIELS UTILISES	72
1.2. SPECIALITES CONTENANT DES ALGINATES	73
1.2.1. Acide alginique	73
1.2.2. Alginate de sodium	73
1.2.3. Autres alginates	74
2. UTILISATION DES ALGINATES DANS LES FORMES SECHES	74
2.1. COMPRIMES A LIBERATION PROLONGEE	74
2.2. UTILISATION DANS LES SYSTEMES FLOTTANTS	75
2.2.1. Comprimés flottants à faible densité	75
2.2.2. Capsules flottantes à faible densité	76
2.3. AGENT DESINTEGRANT	77
2.4. AGENT LIANT	78
3. UTILISATION DES ALGINATES DANS LES FORMES LIQUIDES ET PATEUSES	78
3.1. EXCIPIENTS EPAISSISSANTS ET STABILISANTS	78
3.2. APPLICATIONS EN THERAPEUTIQUE ET EN COSMETOLOGIE	79
3.3. INSERTS POUR LE TRAITEMENT DE LA SECHERESSE OCULAIRE	80

4. ALGINATES ET ENCAPSULATION	81
4.1. LES PROCEDES D'ENCAPSULATION	81
4.1.1. Description des procédés	81
4.1.2. Production industrielle de billes d'alginate	84
4.2. ENCAPSULATION D'ACTIFS	84
4.3. ENCAPSULATION DE CELLULES	85
4.3.1. Transplantation d'ilôts de Langerhans encapsulés	86
4.3.2. Microencapsulation d'hépatocytes	87
4.3.3. Microencapsulation de cellules recombinantes	87
4.3.4. Microencapsulation de cellules de la parathyroïde	89
4.4. AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES ALGINATES EN ENCAPSULATION	90
4.4.1. Réaction du système immunitaire	90
4.4.2. Cytotoxicité	91
4.5. PERSPECTIVES	92
<u>PARTIE 5 : ETUDES EXPERIMENTALES - Réticulation chimique de gels d'alginate</u>	93
1. MATERIELS ET METHODES	94
1.1. LES PRODUITS DE DEPART	94
1.1.1. L'alginate	94
1.1.2. Le pullulane	97
1.2. MISE EN FORME DES GELS D'ALGINATE	98
1.2.1. Préparation des solutions	98
1.2.2. Formation des boudins	98
1.2.3. Formation des billes d'alginate	99
1.2.4. Formation des films chimiques	100
1.2.5. Détermination de la fraction massique en polymère	100
1.3. RETICULATION CHIMIQUE DE L'ALGINATE PAR L'ACIDE ADIPIQUE DIHYDRAZINE	102
1.3.1. Réactifs et solutions utilisés	102
1.3.2. Mécanisme réactionnel mis en jeu	104
1.3.3. Protocole expérimental	105
1.4. ELEMENTS DE RHEOLOGIE	106
1.4.1. Intérêt de l'étude rhéologique	106
1.4.2. Tests mis en oeuvre	107
1.4.3. Choix préférentiel d'une méthode	108
1.5. METHODE DE DOSAGE DU TAUX DE JONCTION AVEC L'AAD	109
1.5.1. Principe du dosage	109
1.5.2. Préparation des solutions nécessaires au dosage	109
1.5.3. Lavage préalable des billes	110
1.5.4. Protocole expérimental	111

1.6. DETERMINATION EXPERIMENTALE DES K_p	112
1.6.1. Définition du coefficient de partage	112
1.6.2. Dosage du pullulane par l'anthrone	113
2. RESULTATS EXPERIMENTAUX	115
2.1. LES DIFFERENTS GELS REALISES	115
2.1.1. Type et nomenclature	115
2.1.2. Fraction massique en polymère dans les différents gels	117
2.2. COEFFICIENT DE PARTAGE K_p : résultats expérimentaux - interprétations	118
2.3. DETERMINATION DU TAUX DE JONCTION AVEC L'AAD	120
2.3.1. Courbe d'étalonnage	120
2.3.2. Résultats obtenus sur les lots de billes	121
2.4. ETUDES RHEOLOGIQUES DES GELS MIS EN FORME	122
2.4.1. Tests de relaxation	122
2.4.2. Tests en mode oscillatoire	124
CONCLUSION	125
BIBLIOGRAPHIE	127
TABLE DES FIGURES	133
ANNEXES	136



INTRODUCTION

Les algues rejetées par la mer et regardées avec indifférence ou dédain par les vacanciers ne méritent peut-être pas un tel oubli...

L'ethnopharmacologie et la pharmacognosie ont pu démontrer qu'un cocktail impressionnant de composants originaux peut être retrouvé dans les algues.

En effet, les substances synthétisées par celles-ci sont très sensiblement différentes de celles fabriquées par les végétaux, tant au niveau des métabolites primaires, comme les polyholosides, qu'au niveau des métabolites secondaires. Cette originalité biochimique serait due aux différences entre les conditions du milieu marin (prédominance des sels halogènes) et celles qui prévalent sur la terre ferme.

Les extraits de végétaux marins sont omniprésents dans notre vie quotidienne. Ils permettent en effet, entre autres emplois, de donner à la plupart des solutions aqueuses que nous utilisons couramment, la texture souhaitée, sans en modifier la saveur, le bouquet, la couleur ou la forme. Ils font partie intégrante de notre confort. Ils sont désignés sous le nom de phycocolloïdes ou sous l'appellation plus générale de " structurants ".

Dès le saut du lit, les yeux à peine ouverts, ne se précipite-t-on pas, pour rafraîchir son haleine sur la brosse à dents et sur le dentifrice ?

Or, le dentifrice n'est finalement que l'association de glycérine, d'un colorant, d'un abrasif, d'un parfum, d'un produit donnant la saveur et d'un détergent, le tout maintenu en une crème épaisse grâce, dans certains cas, à un extrait de plantes marines : l'alginate de sodium.

Sans ce dernier, les différents constituants se sépareraient. Dès qu'on appuierait sur le tube, la glycérine jaillirait d'abord, puis, successivement, les éléments procurant le goût, suivis d'un liquide coloré, du détergent et enfin de l'abrasif. Au lieu de cela, la viscosité provoquée par l'addition d'alginate de sodium maintient les différents éléments en un mélange homogène.

Les propriétés d'épaississement et de gélification de ces polymères sont utilisées dans les domaines pharmaceutique et cosmétologique, afin d'améliorer la stabilité des formes dispersées, de prolonger la libération des principes actifs et de faciliter l'administration.

La première partie de ce document consistera en une approche générale des alginates ; la biochimie de ces polymères ainsi qu'un volet botanique sur les algues sources d'alginates, les Phéophycées, seront abordés.

Une seconde partie s'intéressera à l'extraction industrielle des alginates, depuis la récolte jusqu'au produit final commercialisé. Les différents procédés utilisés seront décrits ainsi que les équipements ; quelques aspects du marché mondial des polymères extraits des algues seront également exposés.

Puis, seront évoquées les propriétés des gels et des solutions d'alginates : une définition assez précise de la "matrice gel" sera donnée, ainsi que les principales caractéristiques des gels d'alginate. Les solutions colloïdales seront brièvement évoquées dans cette partie.

La quatrième partie de cette thèse s'intéressera plus particulièrement à l'utilisation des alginates en tant qu'excipients dans l'industrie pharmaceutique, mais aussi la cosmétologie.

Les applications médicales actuellement utilisées seront explicitées ainsi que les travaux de recherche menés plus particulièrement sur l'encapsulation et les nouveaux modes d'administration des médicaments utilisant ces polymères.

La dernière partie de ce document sera dédiée à une étude expérimentale des gels d'alginate. Outre la réticulation physique des alginates par le calcium, nous nous intéresserons à la mise au point d'une méthode de réticulation chimique par une diamine. Dans cette même partie, on étudiera brièvement le phénomène de partage de phase dans les gels chimiques et physiques : grâce à l'utilisation d'un polysaccharide de masse molaire variable, le pullulane, on pourra réaliser une étude du coefficient de partage (K_p) dans les différents types de gel. En effet, pour une application en relargage contrôlé, il est intéressant de connaître le coefficient de partage des espèces diffusantes entre la phase gel et la phase liquide à l'équilibre.

PARTIE I

GÉNÉRALITÉS SUR LES ALGINATES

1. IDENTITE DES ALGINATES

1.1. HISTORIQUE

[Pérez,1997] [Pérez, 1992]

Les alginates sont connus et utilisés depuis plus de cinquante ans dans les applications alimentaires, mais c'est en 1883 que l'anglais Stanford isola ce qu'il appela "algine" de *Laminaria digitata* ; il ajouta de la soude à un résidu d'algues, filtra le liquide, le concentra puis passa en milieu acide et obtint un précipité gélatineux blanchâtre.

La substance prit le nom d'acide alginique en 1907 quand on s'aperçut qu'elle libérait des ions H⁺ (comme les acides).

Les premiers brevets concernant l'acide alginique ont été déposés par la Kelco Production et l'Algine Corporation of America.

C'est en 1927 que le Docteur Thornley utilisa pour la première fois cet extrait pour agglutiner sous forme de briques des poussières de charbon.

Suite à cette expérience, il mit en place en Californie, la Kelco Company, usine destinée à extraire l'acide alginique de *Macrocystis pyrifera*.

1.2. ELEMENTS DE BIOCHIMIE

1.2.1. Nature chimique

[Dion, Lognoné, 2000] [Michoud, 2001] [Pérez,1997] [Pérez, 1992]

La structure chimique des alginates est voisine de celle de l'acide pectique des végétaux supérieurs.

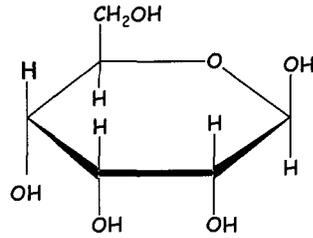
Les alginates sont des **polysaccharides linéaires**, anioniques, constitués des sels de deux acides uroniques dérivant du mannose : l'acide D-mannuronique et son épimère l'acide L-guluronique.

Dans cette partie, nous nous attarderons sur la nature chimique de l'acide alginique dont dérivent les différents alginates actuellement utilisés.

Plus précisément, l'acide alginique est, comme les autres phycocolloïdes, un polymère ; ceci signifie que sa molécule est constituée d'éléments tous semblables (les monomères) reliés entre eux.

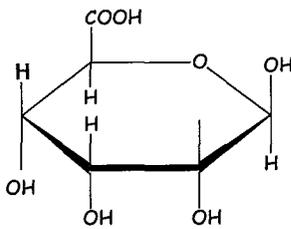
Les monomères dans le cas des algines dérivent de la structure du mannose et sont l'**acide manuronique** et l'**acide guluronique**.

Les figures suivantes présentent les structures chimiques du mannose, de l'acide guluronique et de l'acide manuronique.

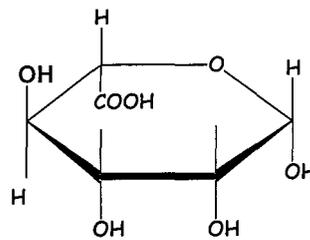


MANNOSE

Figure 1 : Formule chimique du mannose [Pérez, 1997]



ACIDE MANNURONIQUE



ACIDE GULURONIQUE

Figure 2 : Formules chimiques des monomères de l'acide alginique. [Pérez, 1997]

Les monomères sont associés en ligne par des liaisons entre le C1 de l'une et le C4 de l'autre avec départ d'une molécule d'eau et formation d'un pont oxygène.

La figure suivante présente l'association des monomères par formation d'un pont oxygène.

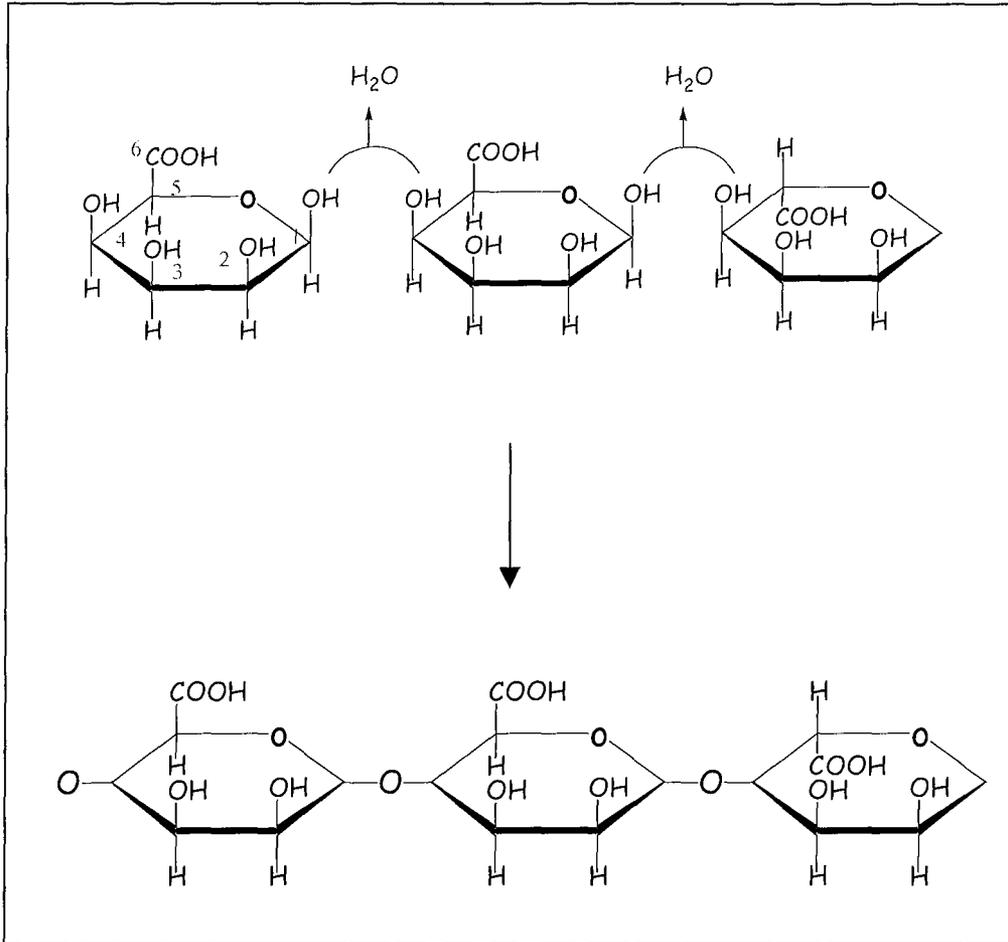


Figure 3 : Formation des liaisons oxygène entre les différents monomères avec départ d'une molécule d'eau [Pérez, 1992]

La position de la liaison C5-C6 est au-dessus du plan moyen du cycle dans le cas de l'acide mannuronique : c'est donc une forme D ; en outre, le radical hydroxyle du C1 se trouve au-dessus du plan : c'est un type β .

L'acide guluronique présente une liaison C5-C6 en-dessous du cycle, c'est une forme L ; le radical hydroxyle du carbone C1 est en-dessous du plan : c'est un type α .

Chaque monomère se place en inverse du monomère précédent : il convient de dire que si l'un est en configuration C1, le suivant se place en position 1C.

La figure suivante donne une idée plus précise de cet agencement :

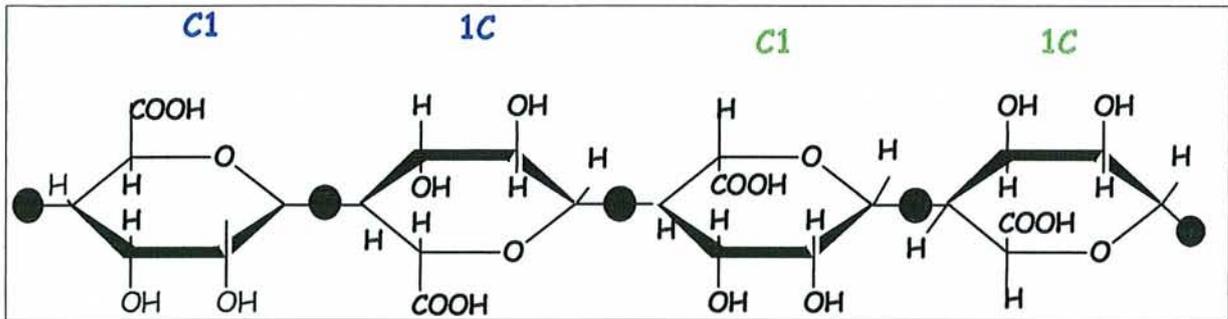


Figure 4 : Agencement des monomères au sein du polymère d'acide alginique [Pérez, 1997]

Aujourd'hui, on connaît parfaitement la structure de la molécule : elle est formée d'un enchaînement de fragments de 3 types :

- * fragments homogènes d'acide D-mannuronique : -M-M-M-M- ; ces séquences sont dites "dures" difficiles à dépolymériser.
- * fragments homogènes d'acide L-guluronique : -G-G-G-G- ; ces séquences forment également des blocs "dures".
- * fragments mixtes des 2 acides : M-G-M-G- ; ce sont des zones fragiles au niveau desquelles se fait souvent la cassure.

Chacun de ces fragments a un degré de polymérisation d'environ 20.

1.2.2. Principales caractéristiques

[Bazin, 1982] [Offret, 1983] [Pérez, 1992]

La plupart des alginates industriels ont un degré de polymérisation variant de 100 à 1000 soit un poids moléculaire compris entre 20 000 et 200 000.

Dans le cas de l'alginate de sodium, il peut varier de 35 000 à 1 500 000.

La teneur en acide guluronique et en acide mannuronique est variable :

Le rapport acide mannuronique/acide guluronique varie de 0,5 à 2,5.

Parmi les phycocolloïdes, les alginates occupent une place tout à fait exceptionnelle en raison de leur caractère anionique lié aux groupements carboxyles -COO^- et en raison de l'absence d'ions OSO_3^- .

L'acide alginique, avec une constante de dissociation $\text{pK}=20.10^{-5}$ se situe entre l'acide acétique plus faible ($\text{pK}=1,15.10^{-5}$) et l'acide monochloroacétique plus fort ($\text{pK}=1,75.10^{-3}$).

Il dérive la lumière à droite avec un angle de rotation $\alpha=-139^\circ$.

A l'état pur, c'est une poudre blanche, inodore et sans saveur.

L'acide alginique est insoluble dans l'eau mais certains de ses sels de sodium, fer, lithium et d'ammonium sont solubles dans l'eau.

De par l'asymétrie du carbone, la configuration spatiale des deux acides uroniques ne peut s'inscrire dans un plan : la molécule se dispose dans l'espace selon une structure dite "en chaise". Lorsque le premier monomère est en position "chaise 1" (C1), le second est en position inversée "1 chaise" (1C).

Ce qui provoque l'**agencement en hélice**, très lâche pour l'acide mannuronique, et très serré dans le cas de l'acide guluronique.

Sur le schéma ci-dessous proposé par Rees en 1970, les points noirs représentent les liaisons C1-C4.

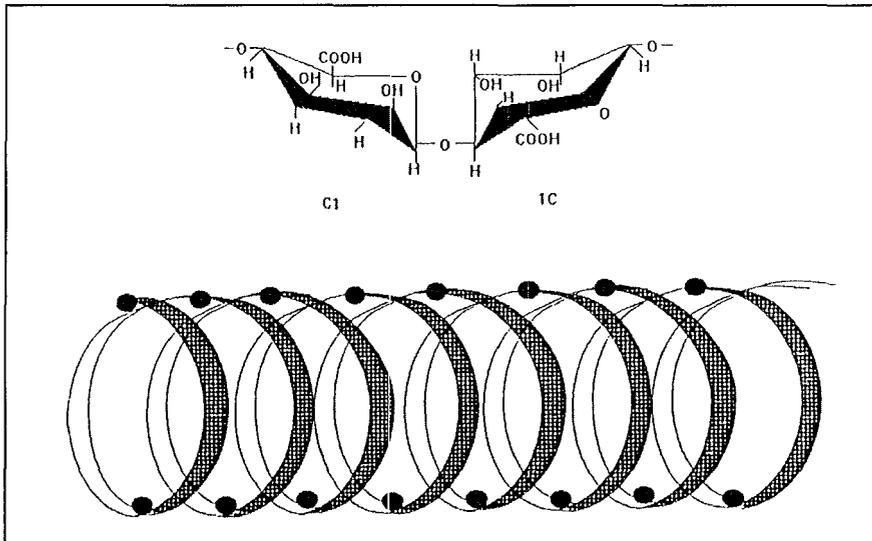


Figure 5 : Agencement en hélice du polymère d'acide alginique. [Pérez, 1992]

1.2.3. Diversité

Il existe sur le marché une diversité d'alginates de sodium qui se différencient au niveau de la proportion des deux acides uroniques constitutifs et de leur répartition le long de la macromolécule, de leurs masses moléculaires et de leurs puretés chimiques et microbiologiques.

Les compositions en acides hexuroniques et leur répartition le long de la macromolécule dépendent des espèces et des tissus considérés.

Le tableau ci-dessous illustre cette diversité de structure .

Tableau 1 : Diversité de composition des alginates. [Algoythme, 2002]
(SMIDSROD et al, 1996)

Matière première	Proportion de guluronate (G)	Proportion de mannuronate (M)	Proportion de dimère guluronate (GG)	Proportion de dimère de mannuronate (MM)
Laminaria hyperborea (lame)	0,55	0,45	0,38	0,28
Laminaria hyperborea (cortex externe)	0,75	0,25	0,66	0,16
Laminaria hyperborea (stipe)	0,68	0,32	0,56	0,20
Laminaria digita	0,41	0,59	0,25	0,43
Ascophyllum nodosum (organe de reproduction)	0,10	0,90	0,04	0,84
Ascophyllum nodosum (tissus âgés)	0,36	0,64	0,16	0,44

La proportion des deux acides uroniques varie non seulement selon les espèces des algues analysées, mais encore suivant l'âge et la région des thalles.

Les parties jeunes et le mucilage médullaire sont plus riches en acide mannuronique. Les parois des cellules adultes et les régions corticales ainsi que les stipes sont plus riches en acide guluronique.

Dans le tableau suivant, on peut facilement se rendre compte de la variabilité des proportions en acide mannuronique selon la partie de l'algue examinée :

Tableau 2 : Proportion d'acide mannuronique (%) dans les alginates extraits des différentes parties de thalles. [De Lestang-Bremond, Quillet, 1980]

<i>Ascophyllum nodosum</i>	%	<i>Laminaria digita, hyperborea</i>	%
Partie supérieure	72	Fronde âgée	55,5
Partie moyenne	61	Fronde nouvelle	65,5
Partie basse	47	Stipe	40
Cortex	50,5	Fronde cortex	33
Moëlle	59	Fronde moëlle	41

2. LES ALGUES SOURCES D' ALGINATES

2.1. GENERALITES SUR LES ALGUES

[Bruneton, 1999] [Donadieu, Basise, 1985]

Les algues sont des végétaux proches des champignons et appartiennent au groupe des Thallophytes.

On distingue deux grandes catégories d'algues : les microalgues, organismes unicellulaires et les macroalgues.

Ce sont les **macroalgues** qui, au niveau industriel, sont utilisées pour extraire les phycocolloïdes faisant l'objet de ce document : les alginates.

Le tableau suivant présente brièvement la classification des différentes familles d'algues.

Tableau 3 : Classification succincte des différents phylums regroupant les algues. [Donadieu, Basise, 1985]

ALGUES	EMBRANCHEMENTS	CLASSES	HABITATS
EUCARYOTES	CHLOROPHYCOPHYTES (algues vertes)	Chlorophycées Zygothécées Charophycées	Eaux marines et douces Eaux douces Eaux douces ou saumâtres
	PHEOPHYCOPHYTES (algues brunes)	Phéophycées	Eaux marines
	CHRYSOPHYCOPHYTES (algues jaunes, vertes ou brunes)	Chrysophycées (jaunes) Xanthophycées (vertes) Bacillariophycées (brunes)	Eaux marines et douces Eaux douces Eaux marines et douces (phytoplancton)
	EUGLENOPHYCOPHYTES (algues vertes ou incolores)	Euglénophycées	Eaux douces
	PYRROPHYCOPHYTES (algues de couleurs variées)	Dinophycées (jaunes ou brunes) Cryptophycées (brunes, bleues, jaunes ou incolores) Raphidophycées (vertes)	Eaux marines Eaux marines et douces Eaux douces et saumâtres
	RHODOPHYCOPHYTES (algues rouges)	Rhodophycées	Eaux marines et douces
PROTOCARYOTES	CYANOSCHIZOPHYTES (algues bleues)	Cyanophycées	Eaux marines, douces ou saumâtres

Les divers phylums qui regroupent les algues comportent, à côté d'organismes unicellulaires, des organismes pluricellulaires formant des thalles complexes, agglomérations de cellules souvent peu différenciées, souples, dépourvues de lignine.

On peut distinguer deux grands groupes d'algues :

- * le groupe des algues eucaryotes ou phycophytes (divisé en 6 embranchements)
- * le groupe des algues procaryotes (ne comportant qu'un embranchement)

Dans ce document, nous nous intéresserons plus particulièrement à 1 classe : les **Phéophycées**.

Les macroalgues sont formées de trois parties plus ou moins nettes :

- * le crampon ou bulbe, simple organe de fixation
- * le stipe, tige cylindrique de longueur variable qui est le corps de l'algue
- * la lame ou thalle qui porte les organes reproducteurs (spores, sporanges, réceptacles) et par laquelle l'algue assure sa nutrition et accumule les réserves.

2.2. LES PHEOPHYCEES SOURCES D'ALGINATES

[Gayral, 1975] [De Lestang-Bremond, Quillet, 1980] [Pérez,1997]

La classe des **algues brunes** (Phéophycées) fait partie du très vaste groupe des Thallophytes chlorophylliens, c'est-à-dire qui ne possèdent ni de véritable vaisseau conducteur, ni racine, ni tige, ni feuille, ni fleur, mais de la chlorophylle "a" photosynthétique. Ils ne contiennent pas de véritable tissu différencié ; ils forment des thalles aplatis ou cylindriques, pouvant imiter plus ou moins grossièrement feuilles et tiges ; en réalité ce sont là des massifs de cellules peu et rarement différenciées, liés entre eux par un ciment polysaccharidique.

De nombreuses algues brunes contiennent de l'acide alginique à des teneurs variables.

Les alginates industriels sont très majoritairement extraits des algues brunes de la classe des Phéophycées.

Les Phéophycées sont toutes des algues pluricellulaires. Leur coloration brune est due à la présence de pigments surnuméraires qui masquent les chlorophylles a et c ; ces pigments jaunes et bruns sont des xanthophylles dont les plus importantes sont la fucoxanthine et la diatoxanthine.

L'amidon fait complètement défaut chez les Phéophycées.

Ces pigments capteurs permettent aux Phéophycées de coloniser les zones littorales sous quelques mètres d'eau, là où la lumière blanche, privée de ses rayons rouges et de l'ultra-violet, comporte encore des radiations oranges et jaunes.

Une espèce est considérée comme un bon alginophyte lorsqu' elle possède une teneur en acide alginique supérieure à 18%.

Les parois cellulaires pecto-cellulosiques sont généralement riches en composés pectiques qui leurs sont propres : les alginates. La majeure partie des alginates se trouve dans les thalles sous forme de gels, surtout calciques, peu solubles dans l'eau salée et dans l'eau froide. La faible fraction entraînable est faite d'une petite quantité plus riche en sels sodiques ou magnésiens, de courtes chaînes natives ou résultant d'une dégradation enzymatique.

2.2.1. Principales espèces exploitées

a. Description des algues

[Bazin, 1982] [Bruneton, 1999] [Delaveau, 2003] [Donadieu, Basise, 1985] [Gayral, 1975] [a]

➤ *Macrocystis pyrifera* : considérée comme la plus grande algue marine ; sa croissance peut atteindre 30 centimètres par jour.

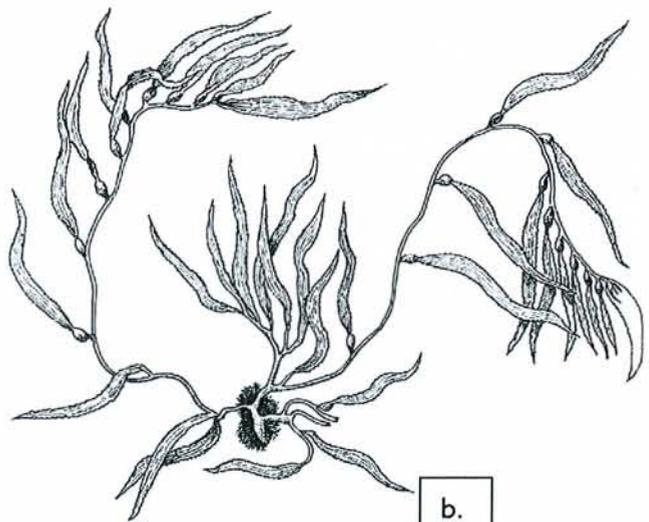
Ces algues géantes (50 à 100m) de l'Océan Pacifique ont une lame divisée en folioles unilatérales à base renflée par une vésicule creuse qui assure la flottaison en surface.

Elle pousse sur des fonds de -10 à -20 mètres et peut être moissonnée 3 ou 4 fois par an d'où son intérêt économique.

On la trouve sur toute la côte Pacifique de l'Amérique (où 120000 tonnes sont récoltées annuellement), la côte Argentine, en Nouvelle-Zélande, en Afrique du Sud.



a.



b.

Figure 6 : *Macrocyctis pyrifera*

a : Photographie de *Macrocyctis pyrifera* [a]

b : Schéma d'un jeune thalle de *Macrocyctis pyrifera*. [Gayral, 1975]

➤ **Les laminaires** : ce sont de grandes algues pérennes de consistance coriace, à stipe cylindrique ou conique fixé aux rochers par des crampons ramifiés. Les laminaires sont abondantes sur les côtes de la Manche où elles occupent le niveau infralittoral (cf. figure n°13), entre le niveau de basse mer et une profondeur d'une vingtaine de mètres.

Ces grandes algues brunes sont très largement retrouvées sur toutes les côtes froides de l'hémisphère boréal. Elles prospèrent sur les fonds rocheux jusqu'à 30 mètres de profondeur et forment de véritables champs découverts seulement aux basses mers. C'est le "goémon de fond".

- *Laminaria hyperborea* est commune sur nos côtes surtout dans le Nord-Finistère.

L'algue est fixée à la roche par des crampons coriaces surmontés d'un stipe dressé, rugueux au toucher.

L'algue mesure 1 à 2 mètres et la fronde se renouvelle tous les ans en hiver.

Elle possède un long stipe cylindrique rugueux qui se prolonge d'un thalle de couleur vert olive tacheté de brun qui s'élargit rapidement pour se diviser en nombreuses lanières souvent étroites.



a.



b.

Figure 7 : *Laminaria hyperborea*

a : Photographie de *Laminaria hyperborea* [a]

b : Schéma de *Laminaria hyperborea*. [Gayral, 1975]

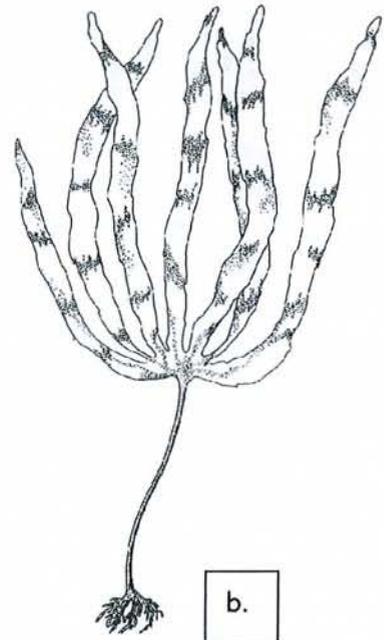
- *Laminaria digita* Lamouroux est également commune sur nos côtes : le stipe est lisse, épais dans son milieu et moins rigide ; la fronde est palmée. L'algue mesure 2 à 3 mètres et est de couleur brun foncé.

Tout comme *Laminaria hyperborea*, elle se fixe aux rochers grâce à des crampons fixateurs.

On la distingue de celle-ci par la couleur, mais aussi par le fait que le stipe est de section ovale alors qu'il est circulaire dans le cas de *Laminaria hyperborea*. De plus, dans le cas de *Laminaria digita*, ce stipe ne se rompt pas facilement quand on le plie.



a.



b.

Figure 8 : *Laminaria digita*

a : Photo de *Laminaria digita* [a]

b : Schéma de *Laminaria digita*. [Donadieu, Basise, 1985]

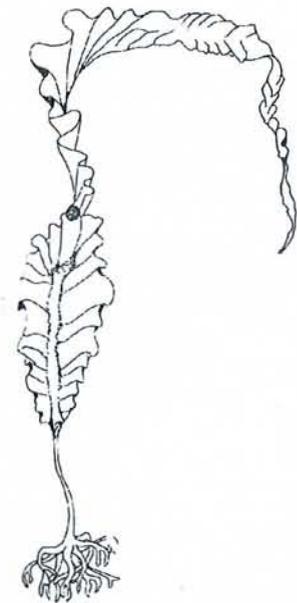
- *Laminaria saccharina* est également rencontrée couramment.

Le stipe est court et la fronde ondulée sur les bords ; sa surface est gondolée et elle peut mesurer 3 mètres.

Elle est de couleur brun-jaune qu'on distingue des deux autres laminaires présentées par le fait que son stipe est court, cylindrique et très flexible. Elle est également fixée aux rochers par un crampon solide. C'est la seule espèce du nord-Est de l'Atlantique qui possède une fronde non divisée et une marge gaufrée.



a.



b.

Figure 9 : *Laminaria saccharina*

a : Photographie de *Laminaria saccharina* [a]

b : Schéma de *Laminaria saccharina* [Delaveau, 2003]

➤ *Ascophyllum nodosum* : ces algues sont souvent découvertes par la marée. Le thalle est composé de nombreuses frondes aplaties, dilatées en leur centre par une vésicule aérifère de grosseur variable.

De nombreuses frondes partent de la base et la plante régénère généralement les frondes à partir de la base quand les plus grosses frondes sont abîmées ou arrachées.



Figure 10 : Photographie de *Ascophyllum nodosum* [a]

➤ **Fucus** : ces algues pérennes abondent sur les côtes des mers tempérées et froides de l'hémisphère Nord.

En Manche, elles colonisent l'espace médiolittoral (cf. figure n°13), c'est-à-dire la zone de balancement des marées. Accrochées aux roches par des disques adhésifs, elles forment des touffes de lanières rubanées, membraneuses, dichotomes.

- *Fucus serratus* : le stipe est aplati et se continue par une fronde qui se divise dichotomiquement et ne présente pas de vésicules aérifères. On la reconnaît facilement grâce à ses frondes dentelées.

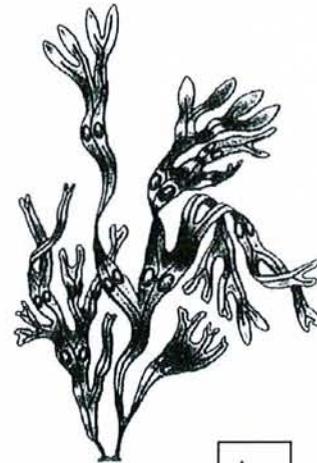


Figure 11 : Photographie de *Fucus serratus* [a]

- *Fucus vesiculosus* appelé également varech vésiculeux du fait de la présence d'aérocystes isolés ou groupés par paires, à paroi épaisse, de part et d'autre de la « nervure » centrale.



a.



b.

Figure 12 : *Fucus vesiculosus*

a : Photographie de *Fucus vesiculosus* [a]

b : Schéma de *Fucus vesiculosus*. [Orecchioni]

Les espèces présentées ici sont les principales algues utilisées pour l'extraction industrielle des algines ; cependant, d'autres algues peuvent également être utilisées, mais de façon plus minoritaire en Europe : *Durvillea* (*Durvillea antarctica*, *D. potarum*), *Lessonia*, *Ecklonia* (*Ecklonia maxima*, *E. kurome*, *E. radiata*) sont utilisées au Chili, en Afrique du Sud, en Nouvelle-Zélande et en Australie. *Turbinaria* et *Sargassum* essentiellement exploitées en Inde et aux Philippines.

Selon leur espèce, les algues prolifèrent dans des zones distinctes qui subissent de façon plus ou moins importante le phénomène des marées.

La figure suivante présente les différents étages littoraux en fonction du mouvement des marées :

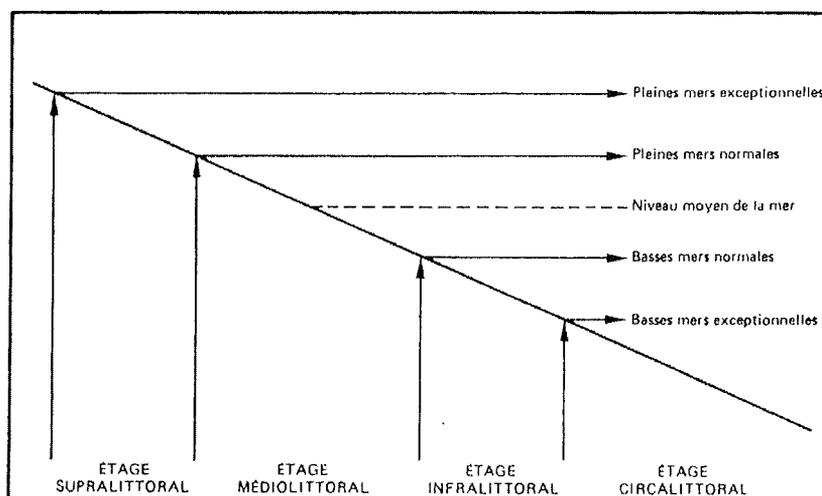


Figure 13 : Coupe schématique du système littoral. [Donadieu, Basise, 1985]

b. Parenté botanique

[Bazin, 1982] [Colwell et coll., 1984]

En Europe, principalement en Angleterre, Norvège et France, ce sont surtout *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria digita* et *Laminaria hyperborea* qui sont exploitées pour fournir des algues.

La figure suivante présente la parenté botanique liant ces différentes espèces.

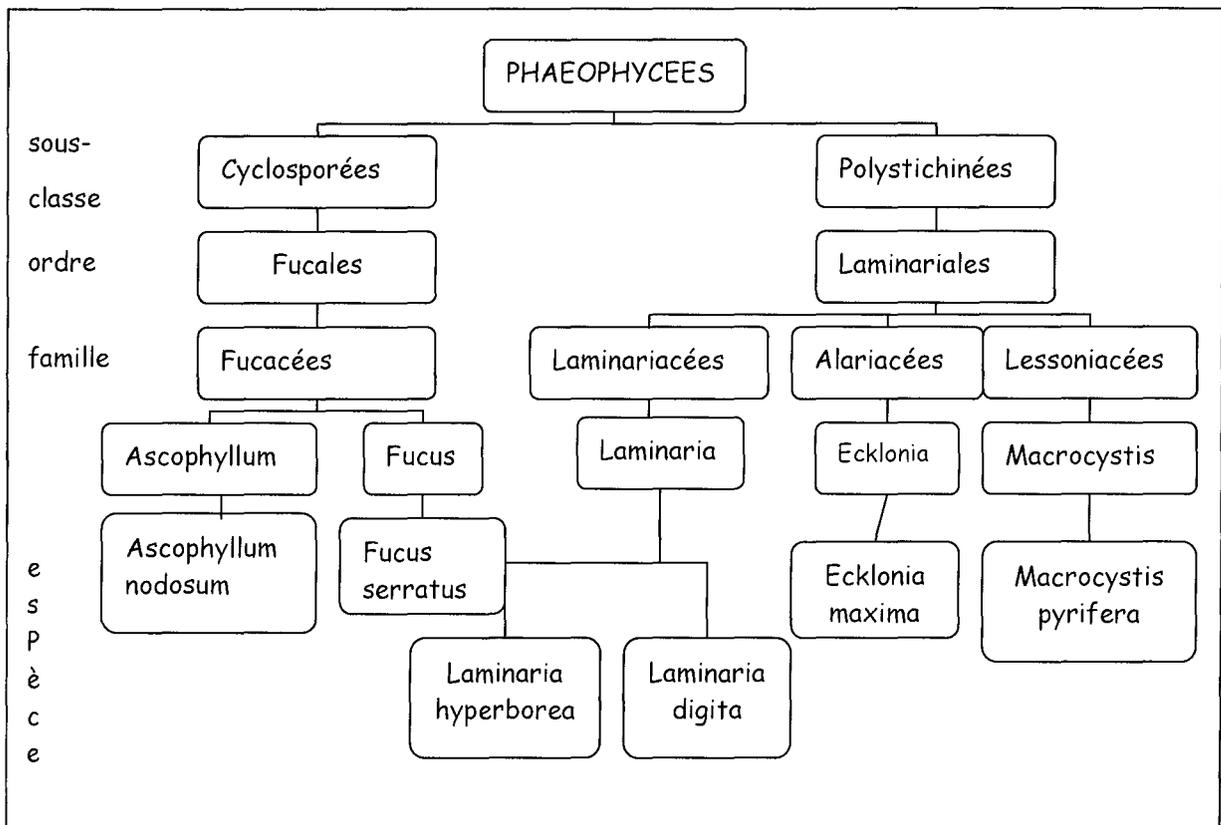
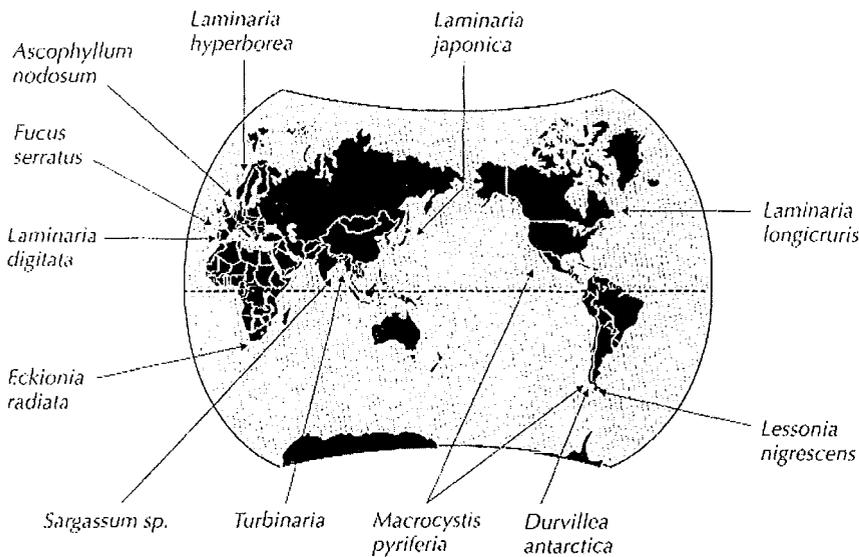


Figure 14 : Parenté botanique des principaux alginophytes. [Bazin, 1982]

2.2.2. Localisation des principaux alginophytes



Zones où sont récoltées les espèces utilisées pour l'extraction de l'acide alginique. L'exploitation concerne principalement les espèces des genres *Laminaria* et *Macrocystis*. Les autres ne sont souvent que des récoltes d'appoint. Seules *Laminaria japonica* et *Macrocystis pyrifera* font l'objet de culture. [Pérez, 1997]

Figure 15 : Cartographie présentant la localisation des alginophytes. [Bazin, 1982]

2.2.3. Localisation des alginates dans les algues

[Draget, 2000] [Pérez, 1992] [Knetting et coll., 1970]

D'après Baardseth (1965), l'acide alginique se situe entre la lamelle moyenne et la paroi primaire de la cellule sous forme d'alginate de sodium, de calcium et d'alginate de magnésium.

On n'en trouve pas trace dans les autres composants cellulaires.

L'acide alginique est un produit du métabolisme cellulaire, mais le rôle du phycocolloïde dans la cellule n'a pas été défini avec certitude.

On suppose que la matrice intercellulaire contenant le gel d'alginate a un rôle dans la force mécanique et la flexibilité de l'algue. Par exemple, chez *Laminaria digitata*, le stipe contient une grande proportion d'acide guluronique qui confère une rigidité importante ; les lames de cette même algue qui subissent l'action du courant contiennent un alginate possédant peu de guluronate et ayant une structure plus flexible.

Le schéma ci-dessous présente la structure d'une cellule de Phéophycées.

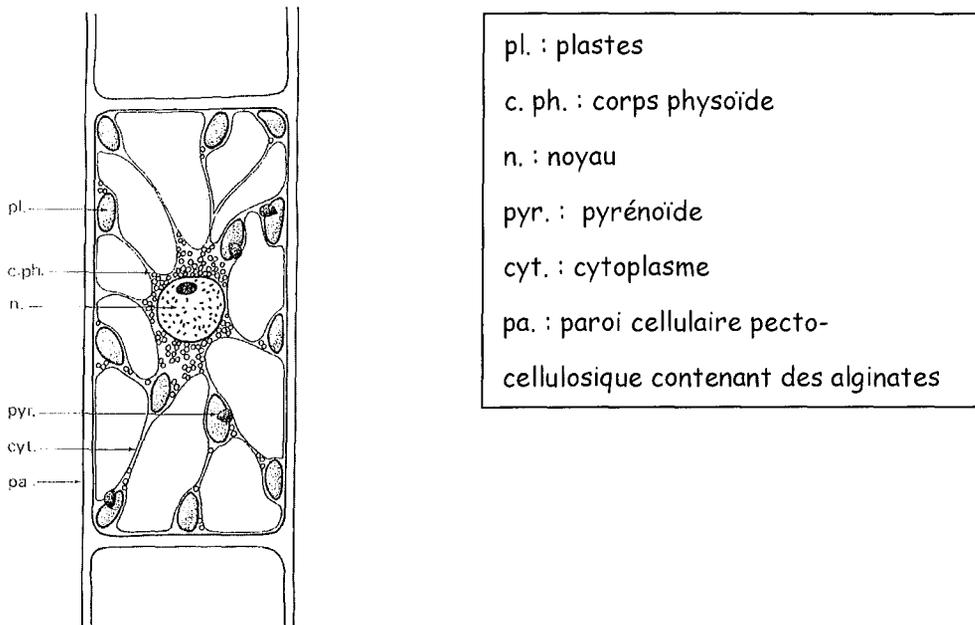


Figure 16 : Structure schématique d'une cellule de Phéophycées. [Gayral, 1975]

Le schéma ci-dessous (d'après Kloareg et al., 1986) localise les alginate dans la paroi des algues brunes.

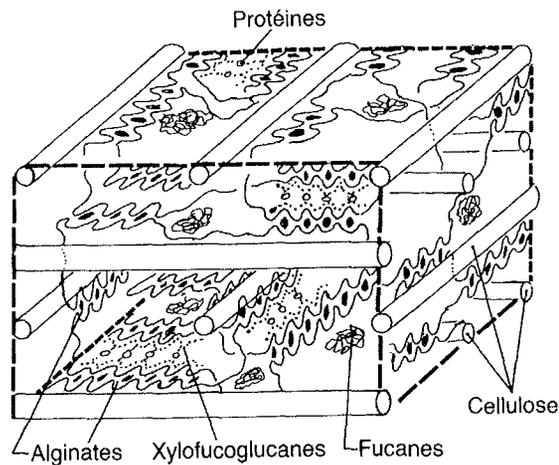


Figure 17 : Modèle proposé pour l'organisation de la paroi chez les algues brunes. [Catesson, Robert, 2000]

2.2.4. Variabilité des algines

[Bazin, 1982] [Pérez, 1992] [Chapman, 1970] [Algorithme, 2002]

La teneur en acide alginique varie avec l'algue : dans une même espèce, elle varie suivant que l'on utilise le stipe ou la fronde.

Elle varie également en fonction de la saison et de la localisation.

Tableau 4 : Teneurs en acide alginique de divers alginophytes. [Pérez, 1992]

ESPECE	Teneur en % de matière sèche
Laminaria	24 à 30
Sargassum	13 à 16
Macrocystis	18 à 21
Ecklonia	35 à 38
Ascophyllum	15 à 20
Lessonia	15 à 19
Fucus	18 à 28
Turbinaria	20 à 22

a. Saison

La teneur en algines semble forte au moment de la période de croissance (printemps) mais par contre, les chaînes du phycolloïde formé sont relativement courtes.

En revanche, la teneur baisse pendant l'hiver mais la polymérisation est maximale. On suppose que la polymérisation reste limitée lorsque la cellule est jeune, puis se réalise complètement après que la cellule a atteint sa taille définitive.

De même, la proportion d'acides mannuronique et guluronique dépend de l'espèce, de la saison et du lieu de récolte.

Les études menées par Ricard (1931) et Lunde (1937) ont montré que chez *Laminaria digita*, il y avait une fluctuation selon les saisons, avec un contenu maximum entre Septembre et Novembre, comme le montre le diagramme ci-dessous.

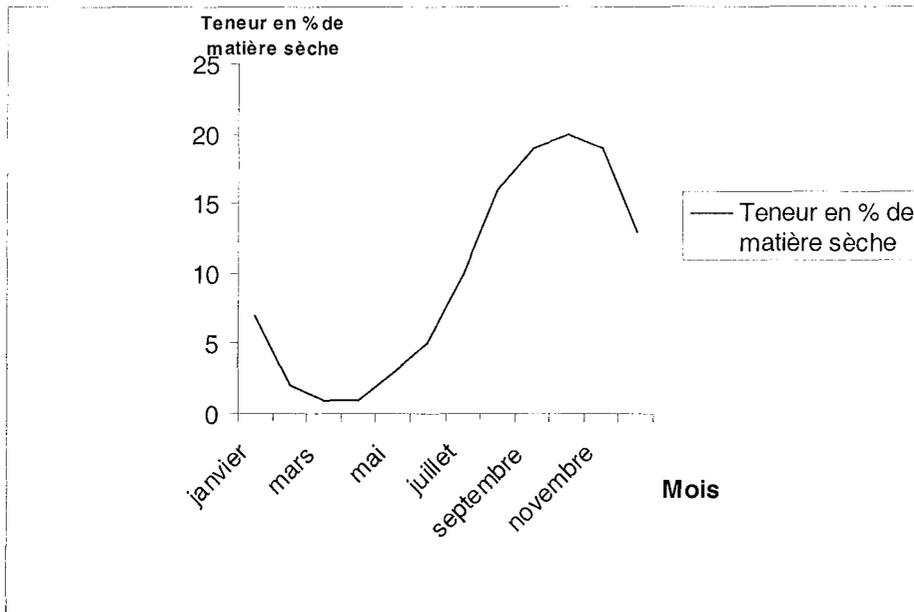


Figure 18 : Variation saisonnière de la teneur en acide alginique chez *Laminaria digita*. [Chapman, 1970]

b. Partie utilisée

Les stipes de *Laminaria* sont plus riches en alginates que les frondes; chez *Durvillea* et *Ecklonia*, c'est l'inverse.

c. Age

On a montré que des stipes de *Laminaria hyperborea* plus âgés contiennent plus de sels d'acide guluronique que des stipes plus jeunes et il n'est pas certain que les producteurs contrôlent avec précision cette variabilité intraspécifique. On a aussi montré que les jeunes frondes de *Laminaria digita* sont plus riches en acide mannuronique que les frondes âgées.

On suppose que la polymérisation reste limitée lorsque la cellule est jeune, puis se réalise complètement dès que la cellule a atteint sa taille définitive.

3. LES ALGINATES D'ORIGINE BACTÉRIENNE

[Ertesvag, Valla, 1998] [Chèze-Lange et coll., 2002] [Saude, Junter, 2002]

La production industrielle des alginates est basée sur la culture des algues brunes ; néanmoins dans la nature, cette famille de polymères est également produite par des bactéries du genre **Azobacter** et **Pseudomonas** (polysaccharide de la capsule). La biosynthèse bactérienne des alginates a principalement été étudiée chez *Pseudomonas aeruginosa*. Tout comme chez les algues, le polymère est d'abord produit sous forme de mannuronane puis, épimérisé par la mannuronan C5-épimérase.

On a recours aux bactéries pour produire les alginates lorsqu'on souhaite obtenir des polysaccharides de composition donnée, avec une distribution particulière des séquences guluronates.

La principale différence entre l'alginate algal et bactérien est le fait que certains des résidus mannuronates des polymères bactériens sont O-acétylés en position 2 et/ou 3.

Actuellement, pour les besoins industriels, on a recours à l'exploitation systématique des algues, mais d'intéressantes perspectives sont à prévoir dans le domaine de l'utilisation industrielle des ressources bactériennes à des fins de production de masse.

Les travaux menés à l'échelle d'un bioréacteur de laboratoire par Chèze-Lange et coll., ont permis la production d'alginates bactériens (utilisant une culture en bouillon de *Azobacter vinelandii*) en continu dans un bioréacteur à membrane.

De même, des études sur la production en batch avec pour substrat le saccharose ont été menées par Saude et Junter ; il s'avère que la production en continu offre de meilleurs rendements que le procédé discontinu.

Après avoir présenté les alginates ainsi que les algues à l'origine de ces biopolymères, nous allons nous intéresser dans la partie suivante à l'étape d'extraction industrielle.

PARTIE II

DE LA RÉCOLTE A L'EXTRACTION INDUSTRIELLE

1. MODALITES DE RECOLTE DES ALGINOPHYTES

[Bazin, 1982] [Pérez, 1992] [Knetting et coll., 1970]

En France, on exploite essentiellement *Laminaria digitata* ; l'exploitation des laminaires relève de l'artisanat et de la petite industrie.

Les 3 principales zones d'exploitation des laminaires en Bretagne sont :

- Perros-Guirec - Les 7 îles
- Roscoff-Brignonan
- Plouguerneau-Le Conquet

La récolte de *Laminaria digitata* plafonne à 65000 tonnes sur les côtes françaises, entre l'île de Bréhat et l'archipel des Glénan.

Le prélèvement s'effectue au moyen de bateaux munis d'un outil spécial appelé "scoubidou mécanique" : un bras articulé porte une longue tige métallique plongeant dans le champ d'algues, et tourne comme une vrille ; les algues s'y enroulent, le bras articulé remonte la tige et les algues sont ramenées au bateau. Cet outil permet une récolte sélective qui préserve les jeunes plantes.



Figure 19 : Collecte de *Laminaria digitata* sur la côte bretonne.

Un outil mécanisé appelé "scoubidou" arrache les laminaires par paquets.

[Pérez, 1997]

Grâce à cet outil, le travail du goémonier est fort facilité : ceci a permis de multiplier par cinq le tonnage récolté au cours d'une marée.

Mais il nécessite des bateaux de longueur supérieure à huit mètres qui ont des difficultés par leur taille à approcher les peuplements situés trop près des roches.

En France, la récolte de *Laminaria hyperborea* est simple : on se contente de ramasser les plantes ou les stipes qui se déposent sur la côte après les tempêtes.

En Norvège, la récolte se fait grâce à une drague à dents qu'un bateau traîne sur le fond de la mer .

Les laminaires sont également largement exploitées en Ecosse, Irlande, Norvège (*Laminaria hyperborea*), en Chine, au Japon et en Corée (*Laminaria japonica*).

Ascophyllum nodosum est prélevée à la main en Irlande, Ecosse et Islande depuis près d'un siècle. On évite l'arrachage car la base fixée au substrat régénère de nouvelles frondes mais malheureusement cette régénération est très lente.

Aux Etats-Unis, on exploite *Macrocystis pyrifera* de façon intensive. Sa culture se fait sur de grandes étendues, à petite profondeur, sur des champs plats : ceci permet une récolte mécanique facile.

On comprend ainsi que le prix de revient des alginates qui en sont tirés est très compétitif.

Durvillea, *Lessonia*, *Ecklonia* sont exploitées au Chili, en Afrique du Sud, en Nouvelle-Zélande, en Australie.

Les espèces *Laminaria* et *Ascophyllum* sont les plus difficiles à récolter car les algues sont accrochées à des surfaces rocheuses sous l'eau.

2. EXTRACTION INDUSTRIELLE DE L'ACIDE ALGINIQUE

[Pérez, 1992] [Pérez, 1997] [Dion, Lognoné, 2000]

Les propriétés des alginates sont à l'origine des procédés d'extraction.

La solubilité dans l'eau des alginates de métaux alcalins et leur insolubilité sous forme d'acide alginique et d'alginate de calcium sont à la base des étapes d'extraction et de purification des alginates.

Les principaux procédés mis en œuvre par les usines d'extraction sont répartis en deux grandes catégories.

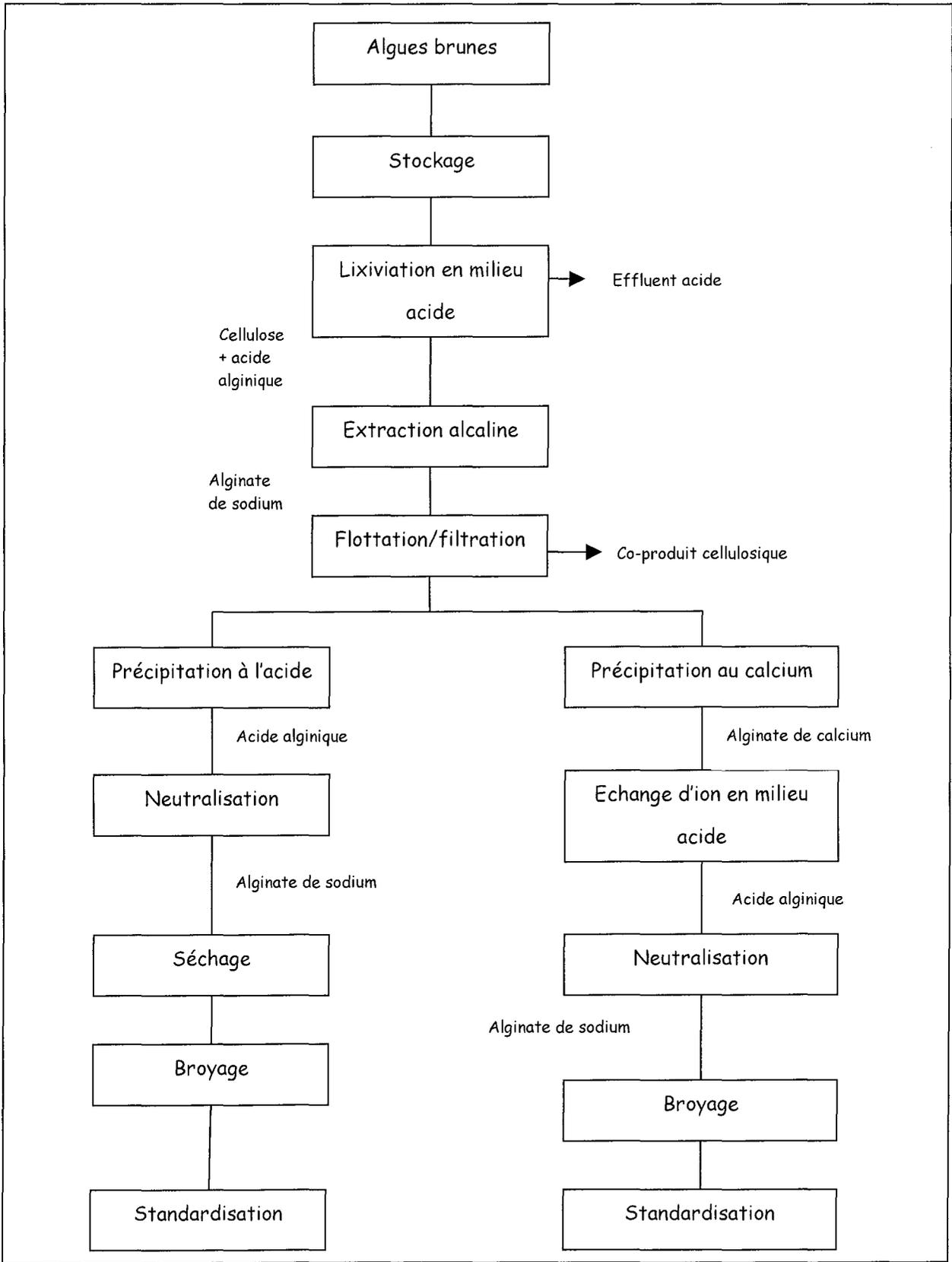
Ils se différencient au niveau de l'étape de purification qui consiste à précipiter l'alginate de sodium en acide alginique dans un cas et en alginate de calcium dans l'autre cas.

Globalement, les différentes étapes du procédé de fabrication des alginates sont les suivantes :

- stockage de la matière première
- lixiviation
- extraction
- séparation solide/liquide
- échange d'ions
- séchage
- broyage
- standardisation

Le diagramme-bloc suivant présente les deux voies d'extraction possibles pour l'extraction de l'acide alginique. Nous verrons plus en détail ces procédés dans la suite de cet exposé.

Figure 20 : Diagramme-bloc des procédés d'extraction de l'acide alginique. [Dion, Lognoné, 2000]



2.1. OPERATIONS COMMUNES AUX DEUX PROCÉDES

2.1.1. Préparation de la matière végétale

Les algues pourrissent vite ; aussi est-il nécessaire de les sécher, de les exploiter rapidement, ou de leur faire subir un traitement conservateur.

Les algues fraîches ou conservées dans une solution formolée sont découpées en fragments de 20 à 30 centimètres de longueur. La fragmentation permet une meilleure action des composants chimiques qui vont être appliqués et facilite le transport par pompage.

Si les thalles ont été conservés séchés, il faut les réhydrater de préférence dans une solution formolée à 5 ou 6%.

La formolisation permet d'éviter les contaminations microbiennes mais aussi d'insolubiliser les polyphénols à l'origine de dépolymérisation des alginates et de coloration des produits.

2.1.2. Formation de l'alginate de sodium

L'acide alginique se trouve dans la cellule sous forme de sels insolubles de calcium et de magnésium. L'objectif consiste à le transformer en sel de sodium soluble.

a . Acidification ou lixiviation

Dans un premier temps, on doit avoir recours à une phase d'acidification par trempage dans une solution d'acide sulfurique pendant une durée de 30 minutes à 4 heures selon l'algue (4 heures pour *Laminaria digitata*), à une température entre 20 et 35°C.

Au-delà, il y aurait dégradation du colloïde.

Le calcium et le magnésium, qui bloquaient sous forme d'un gel dur l'acide alginique dans les parois cellulaires et empêchaient l'extraction, sont dissous par l'acide sulfurique sous forme de sulfate de calcium et de magnésium puis évacués avec les eaux de rinçage.

Plusieurs rinçages à l'eau douce sont nécessaires ; si besoin on prévoira de déminéraliser cette eau par passage à travers des colonnes échangeuses d'ions. On rince jusqu'à ce que les eaux de lavage ne contiennent plus de calcium.

Après chaque rinçage, on réalise un test avec une solution d'oxalate de sodium : s'il reste encore du calcium dans les eaux de rinçage, il se forme un précipité blanchâtre. Tout reste de calcium dans l'algue conduit inévitablement à une perte puisque les molécules d'acide alginique qui auront fixé cet ion resteront piégées dans les produits insolubles.

b. Formolisation

Si les algues n'ont pas trempé dans une eau formolée au cours de la conservation ou au cours de la réhydratation, on les passe, après traitement acide, dans une solution de formol pendant 45 à 65 minutes à 20-25°C.

Le but de cette opération est de stabiliser les phénols qui s'oxyderaient lors de l'étape suivante. Une oxydation donnerait à l'acide alginique une teinte gris à marron, qu'il faudrait éliminer par la suite. Or, le traitement décolorant dégrade la qualité du phycocolloïde.

Le bain dans le formol permet d'éviter l'apparition de la coloration. Une réaction formol-phénol transforme les phénols en produits insolubles qui ne peuvent alors plus s'oxyder et restent dans la phase solide.

c. Carbonatation

Les algues sont alors rincées à l'eau douce puis immergées dans une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 4%.

Pour aller plus vite, on peut augmenter la température jusqu'à 90°C mais il y a une baisse importante de la qualité (les hautes viscosités se dégradent vite).

Pour les algues coupées, 2 heures de traitement alcalin à 50°C suffisent à une extraction totale. Pour *Laminaria digitata*, on préfère opérer à froid ou à 25-30°C de façon à préserver une haute viscosité.

Au terme de cette opération de carbonatation, l'acide alginique, insoluble dans l'eau passe à l'état d'alginate de sodium et se dissout dans la phase liquide.

2.1.3. Isolation de la phase liquide

a. Flottation

C'est la pratique la plus économique : le jus provenant de la carbonatation est dilué 10 à 14 fois avec de l'eau douce et passe dans une puissante pompe qui injecte de l'air sous pression et crée une émulsion.

Les particules solides peuvent ainsi se déplacer aisément dans le liquide rendu moins visqueux par la dilution ; les bulles d'air créées par l'émulsion les amènent à la surface. Pour accélérer le phénomène, on injecte aussi un flocculant au moment de la mise en émulsion : il s'agit d'une substance ayant une charge positive telle que les polyacrylamides.

Les particules de cellulose, chargées négativement, viennent se regrouper autour du flocculant. On obtient des agrégats sur lesquels les bulles d'air peuvent mieux s'accrocher ; la montée en surface est ainsi accélérée.

On peut travailler soit en continu (où la partie liquide du fond est pompée par le bas tandis que la partie solide est prélevée en surface) soit en statique (on attend que le "gâteau" de surface se soit consolidé en fin de flottation et ce résidu solide séché sera utilisé par exemple pour la fabrication d'isolants phoniques).

b. Filtration

Tous les composés insolubles ne sont pas enlevés par flottation. Il faut alors passer à une filtration d'affinage : on utilise un filtre rotatif sous vide comportant un tambour habillé d'un matériel filtrant en pearlite (terre à diatomées) ou silicate d'alumine.

Durant la filtration, la lame de cutter élimine la surface colmatée du filtre, mettant à jour la couche sous-jacente.

Après 10 heures d'utilisation, toute l'épaisseur du filtre a été enlevée et on dispose une nouvelle enveloppe filtrante.

Pour parvenir à un liquide encore plus clair, on peut réaliser une seconde filtration, mais dans ce cas, un simple filtre-pressé suffit car les particules restant à éliminer sont en faible quantité. Il est cependant nécessaire d'ajouter à la solution d'alginate de sodium un pourcentage de terre de diatomées.

La figure ci-dessous présente un filtre rotatif pouvant être utilisé pour l'étape de filtration.

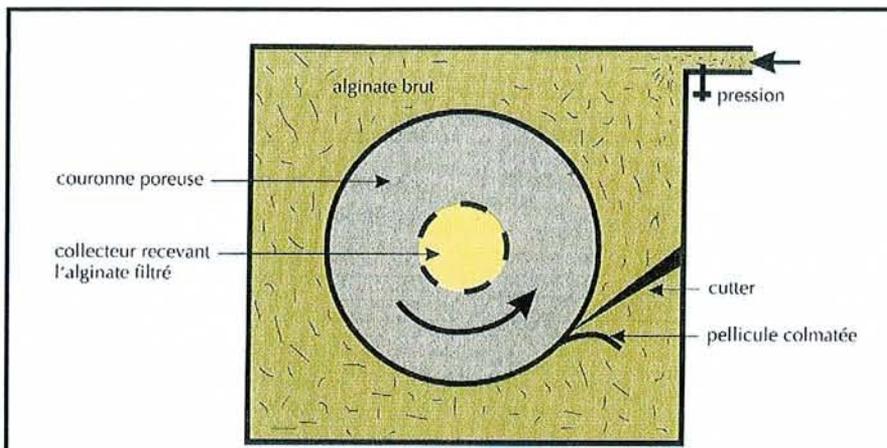


Figure 21 : Système rotatif permettant de filtrer l'alginate de sodium. [Pérez, 1997]

2.2. OPERATIONS SPECIFIQUES A CHAQUE PROCÉDE

[Pérez, 1992]

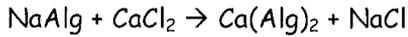
2.2.1. Méthode indirecte : précipitation par le chlorure de calcium

a. Formation de l'alginate de calcium

Le but de l'extraction consiste à obtenir l'alginate de sodium ou l'acide alginique sous forme solide.

Alors que l'évaporation semblerait la solution la plus simple (mais elle dégrade la qualité du produit), on préfère passer par un précipité d'alginate de calcium.

On verse la solution d'alginate de sodium (NaAlg) dans une solution de chlorure de calcium à 10% :



On obtient un précipité fibreux qui peut être séparé sur un écran métallique arrosé d'eau. Le degré de mélange NaAlg-CaCl₂ doit être défini expérimentalement par échantillonnage.

On prendra garde de verser l'alginate de sodium dans la solution de chlorure de calcium et non le contraire, car on obtiendrait dans ce dernier cas un gel à la place des fibres.

La précipitation doit être faite en continu dans un mixer linéaire sur lequel arrive un courant d'alginate de sodium et de chlorure de calcium, ou en une seule masse dans un pétrin.

b. Blanchiment

Cette opération ne sera nécessaire que si l'acide alginique obtenu n'a pas une couleur blanche. Mieux vaut réaliser cette opération sur l'alginate de calcium qui est plus résistant que l'acide alginique.

On fait alors appel à une solution d'hypochlorite de sodium, NaOCl. Lorsque la coloration voulue est atteinte, on sépare l'alginate de calcium de l'eau sur un filtre écran et on rince abondamment la phase solide pour éliminer l'excès de NaOCl.

c. Formation de l'acide alginique

On opère dans trois bassins remplis d'une solution d'acide (H₂SO₄ ou HCl 0,5N) diluée.

On introduit l'alginate de calcium dans le premier bassin ; après 30 minutes d'agitation, on sépare par passage sur filtre-écran. On procède de la même façon dans les deux autres bassins.

Normalement, on obtient un acide alginique sans calcium ; on peut toutefois modérer le traitement décrit pour augmenter le pouvoir épaississant.

d. Déshydratation de l'acide alginique

On utilise un filtre-presse : l'acide alginique est poussé contre une paroi percée de trous très fins permettant l'écoulement de l'eau.

A la sortie de la presse, l'acide alginique contient 25% de matière solide.

e. Conversion acide alginique-alginate de sodium

Cet acide alginique humide (HAlg) est mélangé dans un mixer à un produit alcalin, le plus souvent du carbonate de sodium (Na_2CO_3).

La réaction est la suivante : $2 \text{HAlg} + \text{Na}_2\text{CO}_3 \rightarrow 2 \text{NaAlg} + \text{H}_2\text{CO}_3$

La réaction peut être activée par la température : on travaille le plus souvent à 50°C .

La pâte est extrudée à travers des orifices de 5 millimètres de diamètre et les cordons d'alginate ainsi obtenus sont coupés en morceaux.

Le séchage se fait sur un tapis roulant vibrant formé d'une toile grillagée à travers laquelle passe de l'air chaud.

Les particules ayant moins de 10% d'eau peuvent être broyées en poudre, en grains de $250 \mu\text{m}$.

2.2.2. Méthode directe : précipitation acide

[Pérez, 1997]

C'est le procédé utilisé en France pour *Laminaria digita*.

a. Blanchiment

Ce traitement est également réalisé de préférence en milieu alcalin pour éviter d'abaisser le pouvoir épaississant de l'acide alginique.

Mais, dans le cas d'extraction par acidification directe, l'alginate de sodium se trouve en solution très diluée. La quantité d'hypochlorite de sodium nécessaire serait donc très importante et coûteuse. Les industriels préfèrent alors attendre la dernière opération où l'acide alginique à 25% de matière solide sera transformé en pâte d'alginate de sodium.

b. Formation de l'acide alginique

La solution clarifiée d'alginate de sodium est traitée par une solution d'acide chlorhydrique ou sulfurique à la température de la pièce : un précipité gélatineux, non filtrable dans cet état, se forme progressivement.

Pour arriver à séparer les deux phases, on a pris la précaution de laisser un excès de carbonate de sodium dans la liqueur d'alginate. Sous l'effet de l'acide, le carbonate se décompose en libérant du gaz carbonique qui se prend dans les fibres d'acide alginique en formation et les amène à la surface où se forme une écume blanchâtre.

Il se forme donc progressivement un gâteau de fibres de plus en plus compact.

L'alginate de sodium doit être en contact assez longtemps avec l'acide pour que tous les ions sodium soient enlevés et ne refixent pas ; dans la pratique, on utilise un acide fort (H_2SO_4 ou HCl) et on maintient le pH à 1,5 pendant 60 minutes.

Pour cette étape, on utilise un bassin en plastique possédant un fond en pente dans la première partie (où a lieu le mélange) puis plat (où a lieu la séparation des phases).

Au sommet de la paroi aval est située une roue à aubes qui, à chaque passage de ses pales, transfère l'écume dans un système formé de trois ou quatre presses à vis sans fin qui réduisent la teneur en eau de l'acide alginique à 30%.

c. Déshydratation

Le gel obtenu après l'acidification contient à peine 1 à 2% de matière solide ; il est de plus très hydrophile.

Il faut le déshydrater avant la conversion en alginate de sodium ; selon les cas, on peut utiliser un filtre-presse, la centrifugation, l'alcool.

- **Pressage** : avant passage sur filtre-presse, on place le gel dans des réservoirs à parois filtrantes d'où l'eau s'écoule goutte à goutte.

On peut également utiliser des sacs poreux à la place du filtre-presse : on place le gel dans le sac, on le ferme et le passe sous une presse. Cette méthode chinoise permet d'obtenir un acide alginique à 15% de matière sèche. On peut arriver à 20% de matière sèche si on trempe préalablement l'acide alginique dans l'alcool qui rend celui-ci plus fibreux et diminue ainsi les pertes.

- **Centrifugation** : on place l'acide alginique dans les gobelets percés de la centrifugeuse. On peut ainsi parvenir à 7 à 8% de matière sèche.

- **Alcool méthylique ou éthylique** : le prix de l'alcool étant élevé, ce procédé est peu économique du point de vue industriel.

d. Conversion en alginate de sodium

A la température de la pièce, le gel d'acide alginique à 20% de matière sèche est mis dans un mélange alcool-soude à 40%.

La neutralisation est longue à obtenir car l'alginate et l'acide alginique ne sont pas solubles dans l'alcool.

Quand la valeur du pH atteint 6, la neutralisation est atteinte. Le produit obtenu après neutralisation est mis à égoutter ; il est ensuite écrasé, séché à chaud avec récupération des vapeurs d'alcool. Il est ensuite réduit en poudre plus ou moins fine selon le débouché visé.

La figure suivante présente les différentes étapes d'extraction de l'acide alginique utilisant la méthode directe par précipitation acide : les laminaires stockées dans le formol sont lavées à l'eau douce dans un premier temps ; on procède ensuite à l'acidification puis à la carbonatation. L'acide alginique récupéré à l'issue de ces étapes va ensuite être deshydraté puis séparé par flottation.

La figure suivante présente le procédé d'extraction de l'acide alginique mettant en œuvre la méthode directe par précipitation acide :

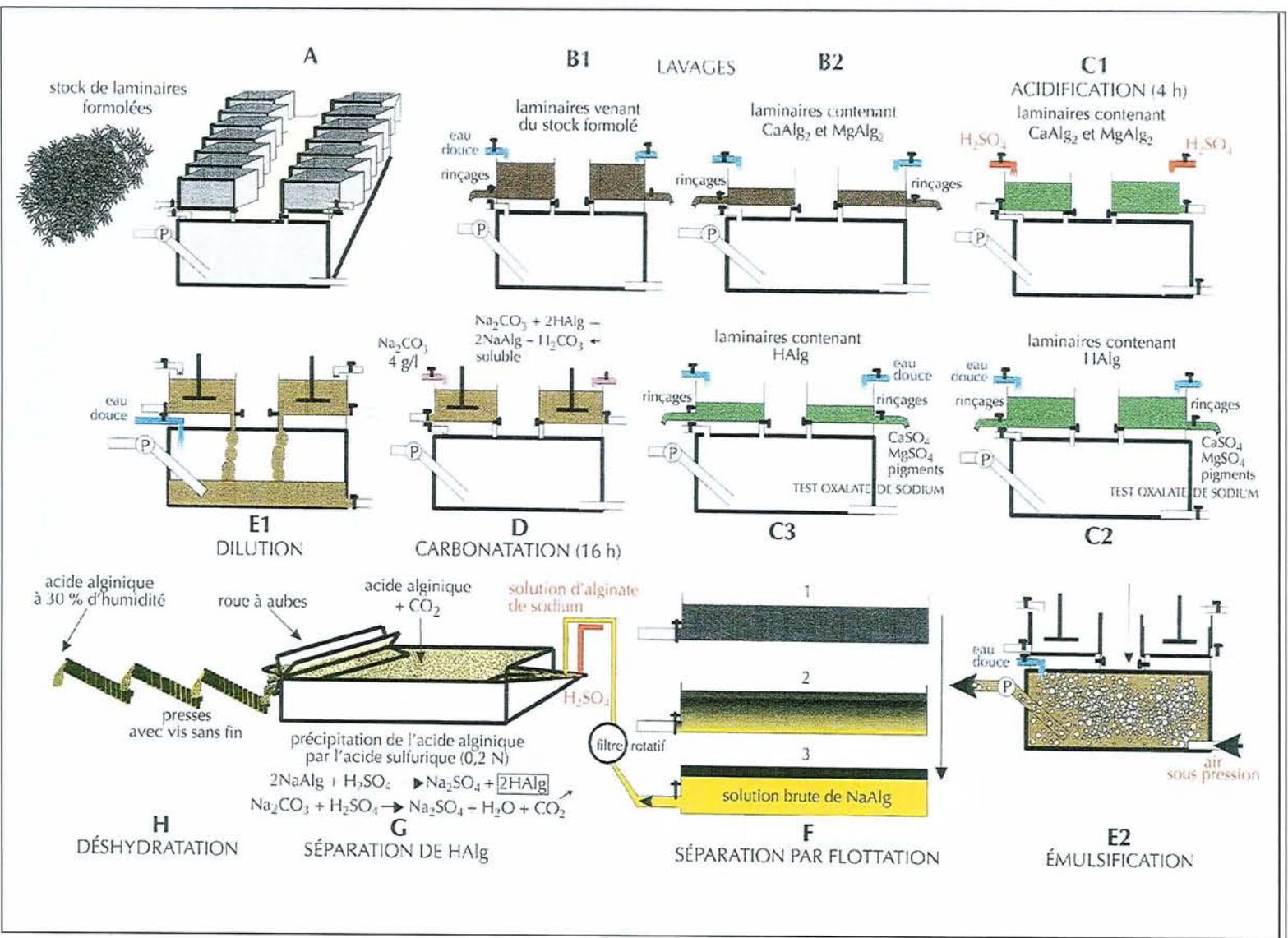


Figure 22 : Organisation d'une usine d'extraction : méthode directe par précipitation acide. [Pérez, 1997]

En fin d'extraction, on note que l'acide alginique peut être déshydraté directement ou alors transformé en alginate de sodium, de potassium, d'ammonium ou de triéthanolamine par neutralisation avec des alcalis et bases correspondantes en milieu aqueux ou alcoolique.

Les alginates sont déshydratés, broyés puis standardisés en viscosité par mélange de lot ou ajout de différents sucres.

L'alginate de propylène glycol est préparé par réaction de l'acide alginique partiellement neutralisé avec de l'oxyde de propylène.

3. L'INDUSTRIE DES ALGINATES

3.1. LES PRINCIPALES USINES

La production mondiale d'alginate dépend de très peu d'usines d'extraction :

- Kelco Company aux Etats-Unis
- Alginate Industry Limited en Ecosse
- Pronova en Norvège et au Canada
- SOBALG (Société Bretonne des ALGues) en France et en Chine
- SBI (Système Bio Industrie) en France
- Ribun et Mitsubishi au Japon

[Pérez, 1997]

3.2. CARACTERISTIQUES DES EQUIPEMENTS D'EXTRACTION

[Pérez, 1992]

Quel que soit le mode d'extraction, il faut environ 1 000 à 1 500 m³ d'eau par tonne de produit fini sec ; l'usine doit impérativement être installée à proximité d'une réserve d'eau importante et près d'un déversoir permettant d'évacuer l'eau chaude chargée de formol, de particules de cellulose, d'acide, de calcium, de divers sulfates de pigments bruns décomposés. Un traitement d'épuration est indispensable.

L'eau d'arrivée doit contenir le minimum de calcium ou de magnésium car ces cations piègeraient l'acide alginique dans les tissus de l'algue, empêchant sa dissolution sous forme d'alginate de sodium.

L'eau ne doit pas contenir d'argile ou des matières en suspension qu'on risquerait de retrouver dans l'acide alginique et qui colmateraient les filtres.

Si c'est le cas, un réservoir de décantation sera nécessaire.

Le niveau bactérien doit être bas, surtout lorsqu'il s'agit d'obtenir des alginates alimentaires ou pharmaceutiques.

En outre, les bactéries de type *Pseudomonas alginovora* décomposeraient l'acide alginique en polymères courts à pouvoir gélifiant et épaississant nul. Ces bactéries pouvant être amenées par l'eau ou par les algues, il faut faire en sorte que leur prolifération ne soit pas possible : d'où la nécessité d'une bonne conservation des algues dans des locaux propres où elles ne doivent pas être gardées trop longtemps.

En cas de conservation par le formol, on surveille la température du stock pour vérifier qu'il n'y a pas de fermentation.

Les bassins doivent avoir des parois lisses, le moins poreuses possible, permettant un nettoyage et une stérilisation faciles.

4. LE MARCHÉ MONDIAL DES ALGINATES

4.1. DE L'ARTISANAT A L'INDUSTRIE

[Chapman, 1970] [Pérez, 1997]

L'acide alginique et ses sels ont été utilisés dans une certaine mesure pendant la première guerre mondiale ; en 1915, une usine voit le jour à Sydney, en Colombie anglaise, pour la production de potasse et d'algine.

Malgré une législation encourageant cette industrie, celle-ci ne s'avéra pas florissante.

Pendant cette même guerre, les alginates étaient préparés à partir de *Macrocystis* en Tasmanie et en Galles du Sud à partir d'*Ecklonia*.

Aux Etats-Unis, l'étude de l'extraction industrielle a commencé pendant la première guerre mondiale au sein de la "Hercules Powder Company".

La véritable épopée de l'acide alginique commence en 1923, lorsque le Docteur Thornley, cherchant à tirer partie de la poudre de charbon éparpillée autour des mines, a l'idée de l'agglutiner en briques compactes en utilisant de l'acide alginique comme colle. Il fonde en 1927, près de San Diego (Californie), la "Kelco Production", usine destinée à extraire l'acide alginique de *Macrocystis pyrifera*. En 1929, la "Kelco Production" devient la "Kelco Company".

La Grande-Bretagne développe son usine d'extraction en 1934 appelée AIL (Alginat Industry Limited).

En France le long du littoral breton, ce sont les unités artisanales exploitant les végétaux marins au dix-septième siècle, qui ont été remplacées par des usines d'extraction d'alginate.

Actuellement, la "Kelco company" est toujours à San Diego et constitue le plus grand centre d'extraction d'acide alginique au monde connu sous le nom de "Nutrasweet Kelco".

Avant la seconde guerre mondiale, aux Etats-Unis et en Europe, deux types de produits sont fabriqués : un alginate de sodium impur appelé "Tiss-tang" et une préparation d'alginate d'ammonium appelée "Armorine".

Au Japon, c'est seulement en 1940 que commença la production mais en 1962, 4 usines produisant 1200 tonnes d'alginate étaient déjà en fonctionnement.

Aujourd'hui pour les goémoniers, la récolte manuelle a été remplacée par la mécanisation ; de même l'industrie et l'amélioration des procédés d'extraction ont permis d'aboutir à des rendements intéressants.

4.2. QUELQUES CHIFFRES SUR LA PRODUCTION

[Michanek, 1984] [Dion, Lognoné, 2000] [Pérez,1997] [Draget, 2000]

Parmi les différents phycocolloïdes présents sur le marché mondial, les alginates constituent très largement la production la plus importante du point de vue des tonnages.

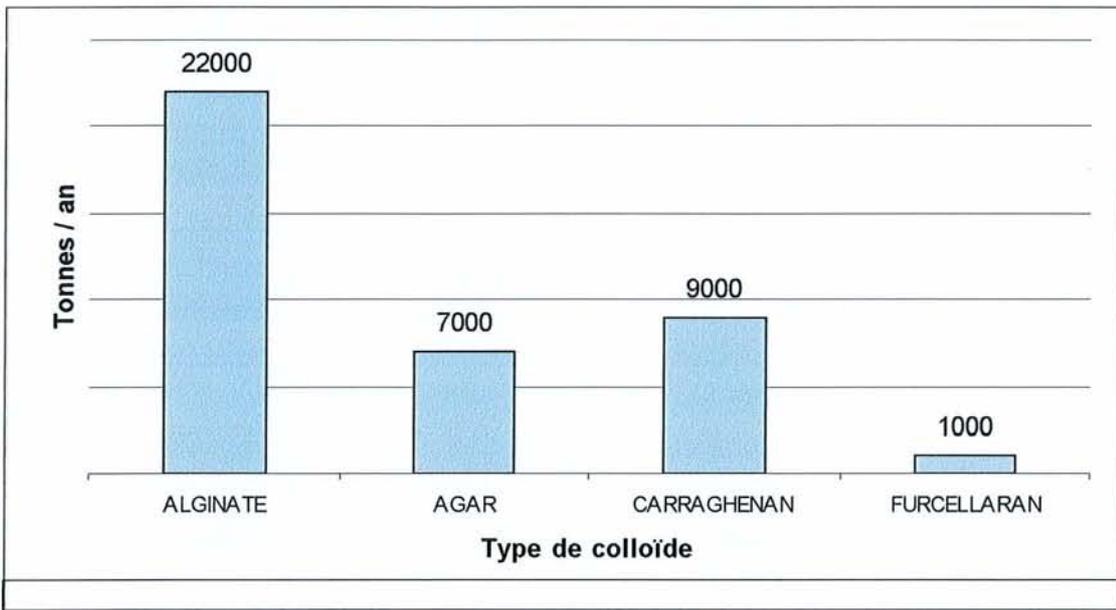


Figure 23 : Commerce mondial en tonnes de phycocolloïdes en 1980. [Michanek, 1984]

En plus d'occuper la première place au niveau des tonnages vendus, les alginates constituent la plus grande part de marché ; néanmoins, compte-tenu des tonnages d'agar et de leur part de marché légèrement inférieure à celle des alginates, on constate que les alginates ne sont pas les phycocolloïdes les plus coûteux.

Le diagramme ci-dessous illustre la part commerciale que représentent les alginate dans le commerce mondial des phycocolloïdes.

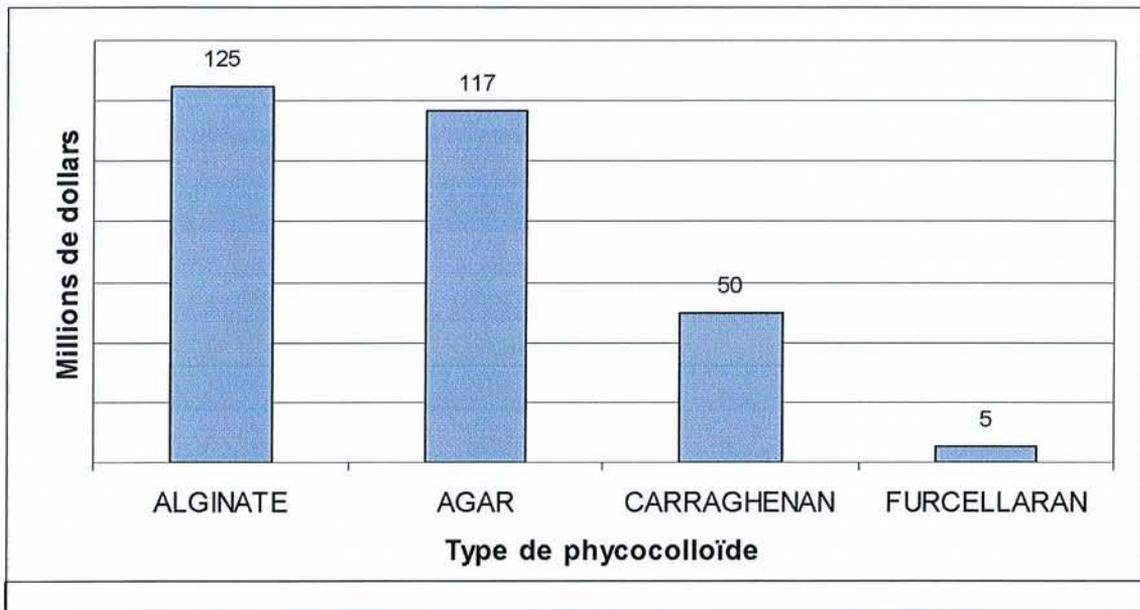


Figure 24 : Commerce mondial en millions de dollars en 1980. [Michanek, 1984]

La production mondiale de 200 000 tonnes d'algues est dominée par l'extrême-orient. Plus de 80% sont récoltés en Chine, au Japon et en Corée. Ces énormes quantités sont essentiellement destinées à l'usage domestique.

Les ressources utilisées dans l'industrie sont modérées comparées à la récolte mondiale d'algues.

La production d'alginate semble localisée dans les zones riches en ressources et jamais loin des zones de marché.

Les deux diagrammes suivants représentent l'importance des différentes espèces d'algues et leur part dans la production mondiale.

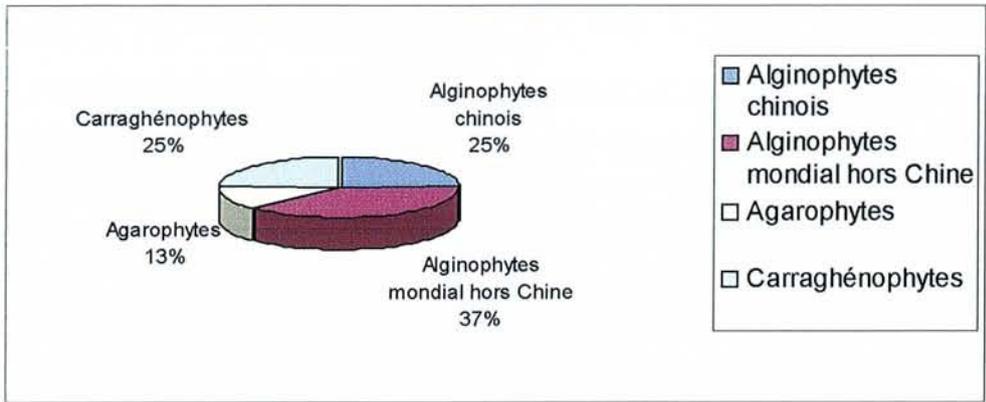


Figure 25 : Production mondiale d'algues à colloïdes en 1995
Place des alginophytes. [Dion, Lognoné, 2000]

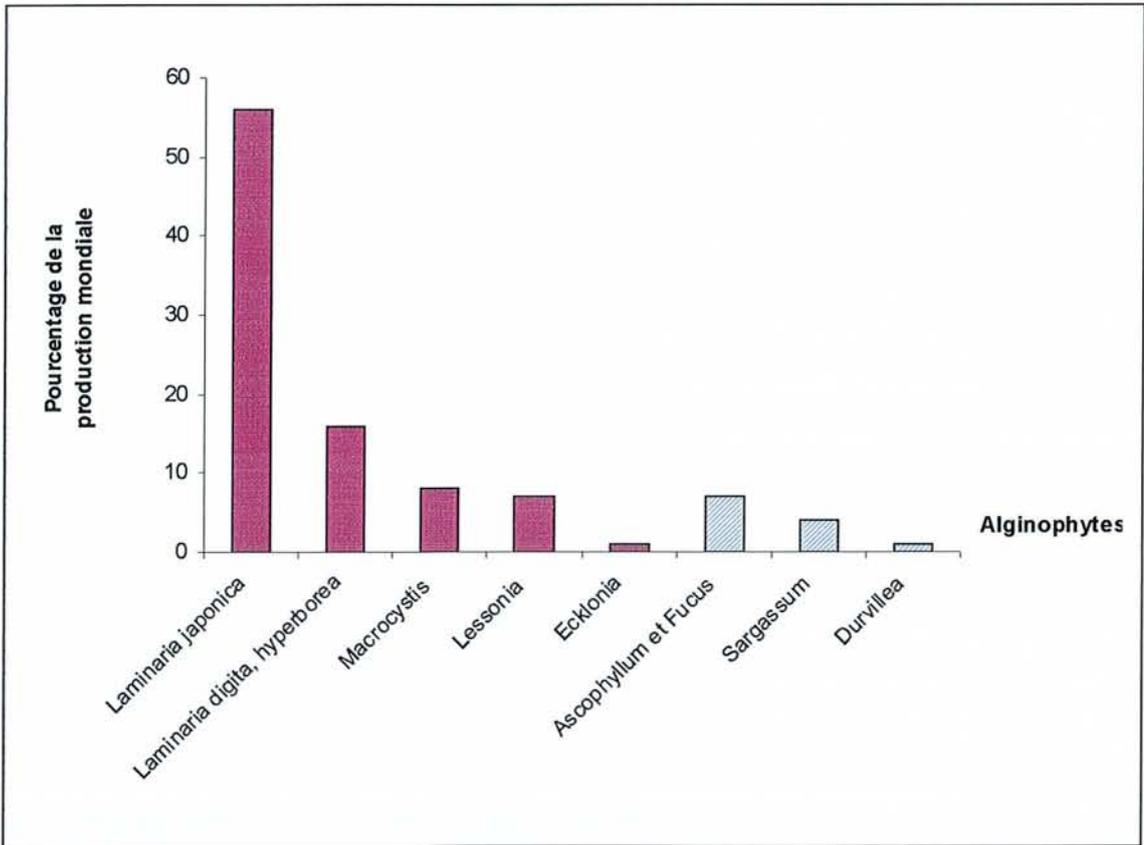


Figure 26 : Production mondiale d'algues à colloïdes en 1995
Place des alginophytes. [Dion, Lognoné, 2000]

Laminaria japonica est très nettement la plus utilisée pour l'extraction des colloïdes ; ceci s'explique par différents phénomènes :

- ✓ la large utilisation des colloïdes en alimentaire dans les pays asiatiques
- ✓ la culture en masse de *Laminaria japonica*
- ✓ la richesse de cette algue en colloïdes

Le schéma ci-dessous montre la part importante qu'occupent les laminaires dans la production d'alginate.

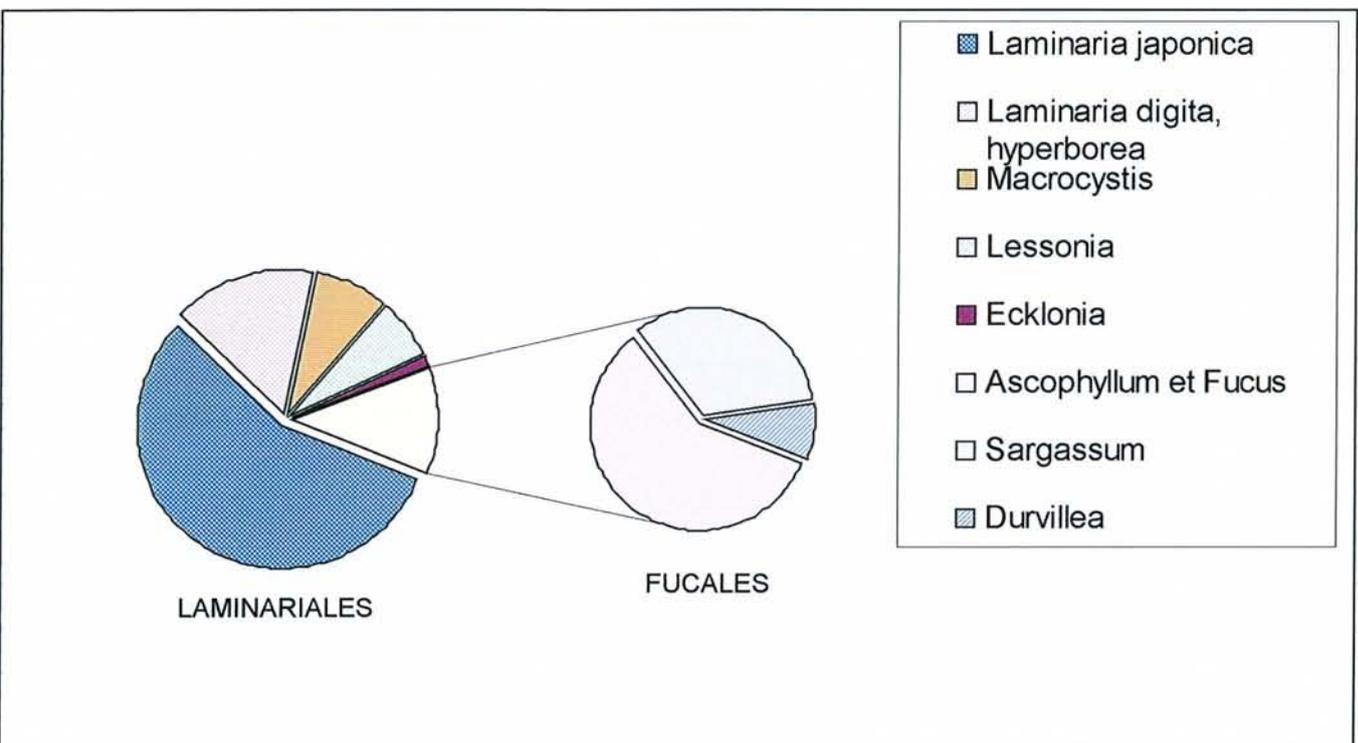


Figure 27 : Part des différents alginophytes dans la production mondiale. [Dion, Lognoné, 2000]

De plus, en 2000, la production mondiale d'acide alginique était de 30 000 tonnes pour une demande de 40 000 tonnes.

On distingue deux catégories d'acheteurs :

- les grands utilisateurs d'alginate qui se fournissent directement auprès des usines d'extraction sans intermédiaire.
- les petits mais nombreux utilisateurs, qui demandent un alginate bien spécifique, correspondant à une utilisation bien particulière.

4.3 LES DIFFERENTS TYPES D'ALGINATES COMMERCIALISES

[Pérez, 1997] [Colwell et coll., 1984]

On distingue trois types d'alginate :

* les alginates à destination pharmaceutique, classés NF par le National Formulary. Entrent dans cette catégorie les alginates épaississant les solutions qui contiennent un principe actif mais aussi les médicaments où l'alginate est le principe actif (environ 12€ le kg).

* les alginates classés " Food " dont le contenu bactérien est constamment sous surveillance (environ 8€ le kg).

* les alginates classés " Technique " dont les utilisations n'ont rien à voir avec l'alimentation humaine (environ 5€ le kg).

Les alginates disponibles pour l'usage industriel incluent les sels de sodium, calcium, ammonium, ammonium-calcium, sodium-calcium de l'acide alginique mais aussi l'alginate de propylène-glycol.

Ces alginates sont produits dans de nombreuses formes variant de part leur poids moléculaire, leur teneur en calcium, la forme des particules (grains ou fibres), la distribution de taille des particules et le ratio acide mannuronique/acide guluronique.

L'alginate de propylène glycol peut aussi varier par son degré d'estérification.

L'annexe 1 présente l'analyse d'un lot d'alginate extrait le *Laminaria digita*.

Dans la partie suivante, nous nous intéresserons plus particulièrement aux propriétés des alginates telles que leur aptitude à former des gels.

Nous examinerons plus particulièrement la façon dont se forment ces gels et les paramètres qui influencent la gélification.

Les alginates en solution seront également brièvement abordés.

PARTIE III

GELS ET SOLUTIONS COLLOÏDALES D'ALGINATES

1. PROPRIETES GELIFIANTES ET VISCOSIFIANTES DES ALGINATES

1.1. NOTION DE GEL

[Tanaka, 1981] [Favre, 2004]

Les gels sont en fait des états intermédiaires entre l'état solide et l'état liquide ; par conséquent, leur classification est difficile.

L'origine de la dénomination gel a été attribuée à T. Graham vers 1850.

Il est formé de polymères réticulés par des liaisons transversales formant un réseau immergé dans un milieu liquide (solvant). La transformation correspondante, qualifiée de transition sol-gel, s'apparente à une cristallisation, et provoque un départ de solvant, dont une partie est expulsée du réseau au point de gélification.

Cette transition reste mal comprise pour les systèmes mettant en jeu des polymères. En effet, les solutions de polymères très concentrées peuvent, dans certains cas, donner naissance à un réseau présentant une résistance mécanique conséquente (module élastique supérieur au module visqueux), emprisonnant une quantité importante de solvant.

Les propriétés du gel dépendent beaucoup des interactions de ces deux composantes : d'une part, le liquide empêche le réseau de polymères de s'effondrer en une masse compacte et, d'autre part, le réseau empêche le liquide de s'écouler.

Les gels obtenus à partir des alginate sont appelés xérogels et, à l'inverse des aérogels, le réseau s'effondre lorsqu'on extrait le solvant par séchage ou compression.

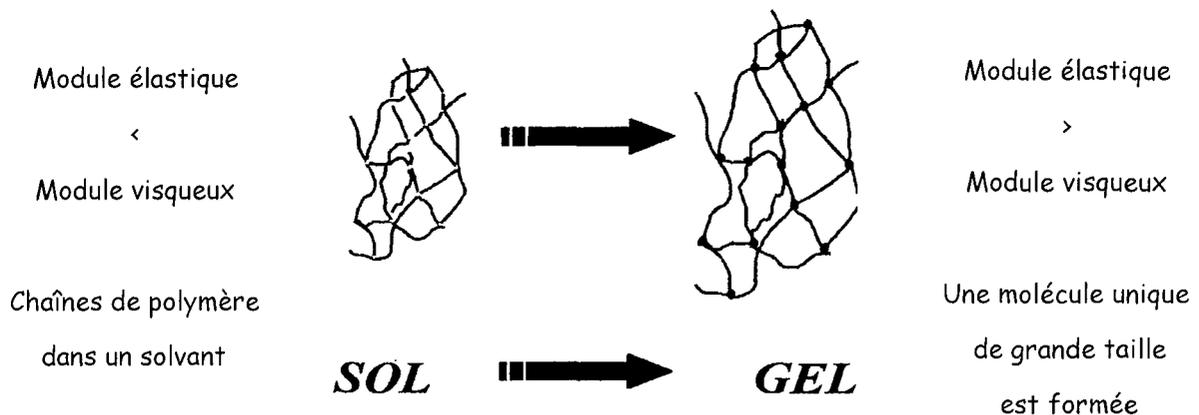


Figure 28 : La transition sol-gel [Favre, 2004]

1.2. THEORIE DE LA "EGG-BOX"

[Lapasin, Prid, 1995] [Kloareg, 1984] [Draget, 2000] [Draget et coll., 1997]

Les propriétés de gélification des alginate sont basées sur leur affinité pour certains ions et leur capacité à se lier à ces ions de façon sélective et coopérative.

La gélification des alginate, induite par des ions divalents, résulte de la capacité de ces composés à former des liaisons ioniques accompagnées de changements conformationnels.

Quand des ions divalents tels que Ca^{2+} sont introduits dans une solution d'alginate de sodium, un réseau expansé se forme.

Cet agencement original est appelé structure en boîte à œufs ou "egg-box" dans laquelle les œufs sont représentés par l'ion.

Le mécanisme mis en jeu est le suivant : les ions divalents tels que le calcium établissent des ponts entre des fonctions carboxyliques portées par les chaînes voisines.

Pour des raisons de stéréochimie, ce mécanisme ne concerne que les blocs polyguluroniques, la conformation ruban plat de l'acide polymannuronique ne permettant pas de complexer le calcium.

Les ions calcium se lient donc préférentiellement aux blocs G, et il a été démontré que ce phénomène est facilité si le bloc guluronate excède 20 résidus.

Pour ce qui est des blocs mannuronate, aucune coopérativité ou changement conformationnel n'ont été mis en évidence quelle que soit la longueur de la chaîne.

La rigidité des gels d'alginate est donc fonction du rapport de l'acide mannuronique à l'acide guluronique des produits commerciaux.

De telles substitutions de Na^+ par Ca^{2+} conduisent à des gels fragiles, les caractéristiques physico-chimiques de ceux-ci dépendent alors du type d'alginate et du mode d'introduction des ions divalents.

Outre le calcium, d'autres ions divalents peuvent être utilisés, l'affinité des alginate pour les métaux terrestres alcalins étant la suivante :

$\text{Mg} \ll \text{Ca} < \text{Sr} < \text{Ba}$

Ainsi, le baryum et le strontium remplissent mieux l'alvéole que le calcium.

Les figures suivantes présentent le rôle d'un cation divalent, le calcium, dans le phénomène de gélification des alginate.

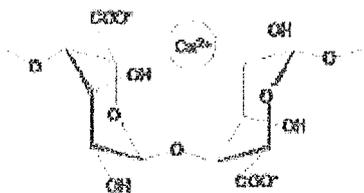


Figure 29 : Formation de ponts avec le calcium [b]

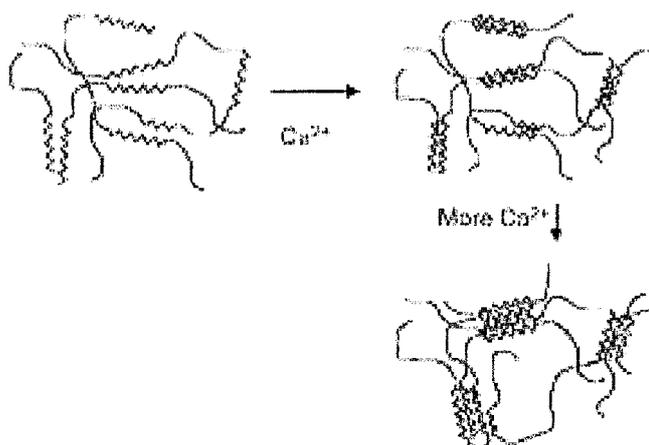


Figure 30 : Mise en place de la structure " boîte à œufs " en présence de calcium [b]

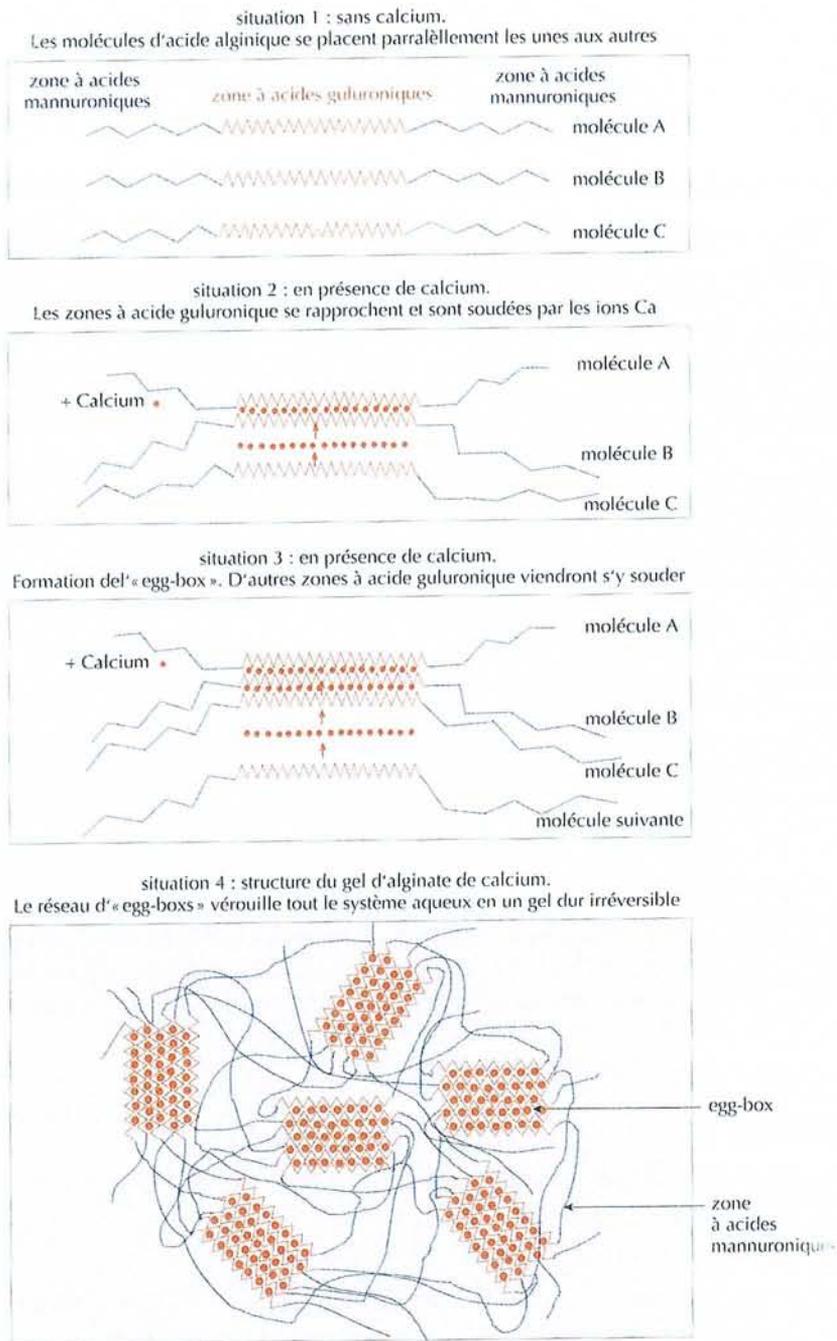


Figure 31 : Rôle des zones à acides guluroniques dans la structure en "boite à oeufs" [b]

1.3. SOLUTIONS COLLOÏDALES

La stabilité d'une solution colloïdale résulte d'un équilibre entre des forces qui tendent à disperser les molécules de solvant (forces de solvation, forces de répulsion entre les molécules de soluté...) et des forces qui tendent à les agglutiner (forces de tension superficielle, interactions positives soluté-solvant).

Une solution diluée de polymères est une solution dans laquelle chaque chaîne polymérique occupe un domaine sphérique propre.

Lorsque la teneur en polymères de la solution augmente, on atteint une concentration ($c=c^*$) à partir de laquelle les pelotes de polymères commencent à se chevaucher : c'est la **concentration critique**.

Les solutions dans lesquelles la teneur est supérieure à cette limite ($c>c^*$) sont appelées solutions semi-diluées de façon à les distinguer des solutions concentrées dans lesquelles la densité de chaîne est bien plus élevée.

La figure suivante illustre l'effet de la concentration du polymère sur la structure des solutions macromoléculaires.

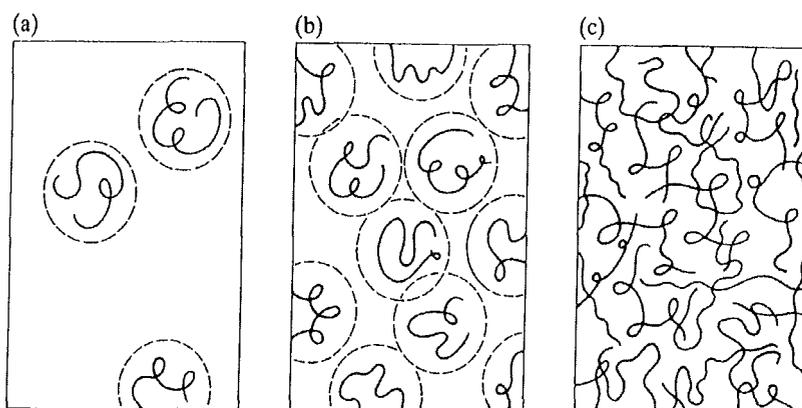


Figure 32 : Illustration de l'effet de la concentration c du polymère sur la structure d'une solution macromoléculaire : (a) solution diluée ($c < c^*$) ; (b) : début du recouvrement des pelotes ($c \approx c^*$) ; (c) : solution semi-diluée ($c > c^*$)

Les pointillés indiquent les volumes moyens occupés par les molécules individuelles en solution diluée. [Dickinson, 1992]

1.3.1. Transition sol-gel

[Kloareg, 1984] [Favre, 2004]

Dans le cas des solutions aqueuses de phycocolloïdes, l'affinité de ces polysaccharides pour l'eau est grande.

Les forces d'agglutination sont donc principalement des interactions intermacromoléculaires, de nature polaire, complexante ou ionique. Si elles ne suffisent pas à compenser les forces et l'entropie de dispersion, on a affaire à un système microdispersé : un **sol**.

Si, à l'inverse, elles deviennent prépondérantes, il y a floculation, et même possible précipitation. S'il n'y a pas précipitation des particules, on aboutit à la constitution d'un réseau tridimensionnel de macromolécules qui supporte et retient plusieurs couches de solvant ; c'est le phénomène de **gélification**.

Ce processus progressif correspond à la formation d'un amas de polymère de taille croissante qui va atteindre finalement celle du récipient où s'effectue la gélification : c'est le **point de gel**.

L'ensemble est pris en masse dans un état semi-liquide, semi-solide : le **gel**.

Une propriété intéressante des sols est leur viscosité, c'est-à-dire leur résistance à l'écoulement et au cisaillement.

A l'échelle moléculaire, la viscosité mesure l'intensité des forces de frottements qui s'opposent aux déplacements des molécules du liquide les unes par rapport aux autres lorsqu'on les met en mouvement.

Le paramètre qui caractérise le mieux les gels est, non plus la viscosité, mais la rigidité, qui mesure leur résistance à la déformation ou à la pénétration.

Cinétique de gélification :

La cinétique de gélification est le plus souvent exprimée au travers du degré d'avancement de la réaction noté p .

$$p = \frac{\text{nombre de moles de jonctions}}{\text{nombre de moles de groupements fonctionnels au départ}}$$

Au point de gélification, pour lequel des variations spectaculaires des propriétés mécaniques sont observées, la valeur du degré d'avancement est p_c .

Le temps de gel t_g correspond à la durée à partir de laquelle le module élastique du milieu croît rapidement et l'emporte sur le module visqueux.

Divers auteurs, parmi lesquels Flory, ont cherché à exprimer le formalisme de la transition sol-gel.

Le point de gel est obtenu lorsque la masse molaire du réseau en cours de formation tend vers l'infini.

Le calcul aboutit à des expressions algébriques sous forme de sommes de termes mettant en jeu les concentrations des espèces au départ, la fonctionnalité des nœuds de réticulation, ainsi que des constantes probabilistes.

On obtient alors la valeur du degré d'avancement p pour lequel la masse molaire du réseau tend vers l'infini.

1.3.2. Pouvoir gélifiant des alginate

[Pérez, 1997]

Si l'on verse dans un verre contenant 100 millilitres d'eau distillée quelques grammes d'alginate de sodium, on peut, après dissolution de l'alginate, retourner le verre sans que l'eau ne s'écoule. Cette petite expérience démontre clairement l'hydrophilie de l'acide alginique.

Il est soluble sous la forme de sels formés avec des ions monovalents Na^+ , NH_4^+ , K^+ ainsi que sous la forme d'alginate propylène-glycol et d'alginate de triéthanolamine.

Il est alors le plus fort des épaississants connus.

En solution, l'alginate n'apporte ni goût, ni odeur, ni couleur : il ne modifie donc pas la solution dans laquelle il est incorporé. Il en change uniquement la viscosité.

La structure de l'acide alginique lui permet de former à froid des gels durs, irréversibles, pouvant résister à 400°C.

1.4. TECHNIQUES DE GELIFICATION

[Desprairies, 2002] [Algorithme, 2001] [Draget et coll., 1997]

On distingue en fait trois techniques :

* **Gélification externe ou par diffusion** : c'est la technique la plus simple. Elle est mise en œuvre à température ambiante.

Une solution d'alginate est versée goutte à goutte dans une solution contenant du calcium libre.

La gélification de l'alginate est immédiate à la périphérie de la goutte. Des échanges peuvent ensuite se produire entre l'intérieur et l'extérieur de la gouttelette.

Quand l'alginate doit jouer le rôle de matrice immobilisante, on aura recours à cette technique de gélification.

Par conséquent, on utilise principalement cette méthode dans la fabrication de billes, films et fibres ; ce principe est mis à profit pour réaliser des encapsulations d'enzymes ou bactéries.

L'inconvénient de cette méthode est la non uniformité du produit obtenu : la concentration en alginate décroît de la surface au centre du gel.

Néanmoins, on peut contrôler l'homogénéité : l'homogénéité maximum sera obtenue en utilisant des alginates de haut poids moléculaire avec de fortes concentrations aussi bien en ions gélifiants que non-gélifiants ; on peut également améliorer l'homogénéité en ajoutant du chlorure de sodium (cf. partie expérimentale).

* **Gélification interne** : dans cette technique, le calcium est présent dans la masse du produit et réagit avec l'alginate suivant une cinétique contrôlée.

Elle a lieu, tout comme pour la méthode précédente, à température ambiante.

Pour obtenir un gel d'alginate homogène, il convient de piéger le calcium du milieu. Une fois le calcium piégé, l'alginate peut se dissoudre. Ensuite, un sel de calcium à dissolution lente libère progressivement le calcium qui peut réagir avec l'alginate pour donner un gel.

La source de calcium est principalement du sulfate dihydraté dans les systèmes à pH neutre et du phosphate dicalcique dans les systèmes à pH acide. Dans les systèmes acides, c'est le pH acide qui permet de solubiliser et d'ioniser le calcium.

La cinétique peut être contrôlée en jouant sur la taille des particules et l'abaissement du pH avec la glucono- δ -lactone par exemple.

Dans les systèmes neutres, un séquestrant du calcium est utilisé pour réagir avec celui-ci avant l'alginate. La présence de séquestrant permet d'homogénéiser les solutions avant la gélification.

* **Gélification par refroidissement** : tous les constituants nécessaires à la gélification (alginate, source de calcium, séquestrant) sont mélangés à chaud. L'organisation du gel se met en place au refroidissement. Le gel n'est pas thermoréversible mais il est moins sujet à la synérèse que les gels mis en œuvre à froid.

1.4.1. Variabilité des gels obtenus

[Colwell et coll., 1984] [Pérez, 1992] [Chapman, 1970] [Mancini et coll., 1999]

Le degré de conversion en alginate de calcium est théoriquement de 100% quand le ratio molaire entre les ions sodium et calcium est de 0,5. Néanmoins, le gel obtenu va dépendre de nombreux paramètres dont quelques uns sont détaillés ci-dessous.

a. Agents séquestrants

Le taux de gel formé ainsi que la qualité et la texture du gel obtenu peuvent être modifiés par l'addition contrôlée de calcium.

Le système gel obtenu peut aussi être contrôlé avec des agents séquestrants, ceux-ci réagissent préférentiellement avec les ions métalliques polyvalents. Les agents séquestrants enlèvent une partie du calcium et cela perturbe l'équilibre de l'alginate. Les plus communs sont les polyphosphates tels que l'héxamétaphosphate de sodium ou le tripolyphosphate de sodium.

Du point de vue stoechiométrique, une substitution complète nécessite une quantité de calcium de 7.2% en poids de l'alginate de sodium. Grâce à l'ajout d'agents séquestrants, les gels sont formés pour 3% de calcium en masse.

b. Ratio acide mannuronique/acide guluronique

Du fait de la possibilité de se disposer en "egg-box", les séquences d'acide guluronique sont plus réactives que celles d'acide mannuronique. Ainsi, l'acide alginique sera d'autant plus gélifiant que sa teneur en acide guluronique sera élevée.

Le rapport acide mannuronique/acide guluronique indiquera la qualité du phycocolloïde.

Les expériences menées par Mancini et coll. ont permis d'aborder par le biais d'expériences empiriques cette variabilité.

La capacité de gélification des agents gélifiants est communément mesurée grâce à un paramètre empirique évaluant les propriétés mécaniques : la **force de gel**. Celui-ci est évalué en soumettant des gels échantillons à un tests de compression uniaxial et à un test de contrainte de relaxation.

Ces séries d'expériences menées sur des gels contenant des proportions variables de blocs G et M ont abouti à la conclusion suivante : quelle que soit la concentration, les gels riches en blocs mannuronate semblent plus souples et plus élastiques que ceux riches en blocs G (mesure des coefficients viscoélastiques adimensionnels A_i et de la contrainte de relaxation initiale $G(0)$).

c. Taux de polymérisation

La viscosité augmente parallèlement au taux de polymérisation du polysaccharide mis en œuvre : d'une façon générale, plus la masse moléculaire d'un polymère est élevée et plus la viscosité sera élevée pour une même concentration.

Par exemple, en période de croissance des algues (printemps), les chaînes sont relativement courtes, ce qui amène à l'obtention d'alginate à viscosité modérée.

2. PROPRIETES DES GELS D' ALGINATES

2.1. SOLUBILITE

[Desprairies, 2002] [Draget, 2000] [Draget et coll., 2000] [Razzouk, 1998]

Les alginates sont solubles à froid et permettent ainsi d'obtenir facilement des solutions visqueuses. Grâce à sa solubilité dans l'eau, c'est l'alginate de sodium qui est le plus utilisé bien qu'insoluble dans l'éthanol et les solvants organiques.

Cependant, la solubilité est inversement proportionnelle à la longueur des chaînes.

Trois paramètres essentiels déterminent et limitent la solubilité des alginates dans l'eau :

* le pH du solvant : les constantes de dissociation des monomères d'acide mannuronique et guluronique sont respectivement 3.38 et 3.65.

La valeur du pKa du polymère d'alginate est assez voisin de ces valeurs mesurées pour les monomères.

Une chute brutale du pH va entraîner la précipitation des molécules d'acide alginique, alors qu'un ajout progressif de protons va permettre de former un gel d'acide alginique.

On note que pour des valeurs de pH faibles la solubilité dépend des séquences constituant le polymère, selon l'ordre suivant :

Séquences GG < séquences MM < séquences MG

* la force ionique du milieu : tout changement de la force ionique d'une solution d'alginate a un effet sur le comportement du polymère, plus particulièrement sur le déploiement de la pelote statistique mais aussi sur la viscosité de la solution. Pour des forces ioniques très importantes, la solubilité va également être affectée.

* la présence ou non d'ions favorisant la gélification : la dureté de l'eau (reflétant la charge en ions calcium) a ainsi une grande importance.

En dessous d'une certaine teneur en ions calcium, seuls 1 à 3% des alginates vont être retrouvés en solution.

Dans les milieux riches en calcium libre, la dissolution nécessitera alors la présence d'un agent complexant.

L'acide alginique et les sels de métaux divalents (alginate de calcium) ou trivalents sont insolubles, excepté l'alginate de magnésium.

Les alginates de sodium, potassium, ammonium sont solubles à froid.

2.2. VISCOSITE

[Desprairies, 2002] [Colwell et coll., 1984]

On s'intéressera ici plus particulièrement à la viscosité des alginates en solution.

Les alginates commercialisés peuvent être dissous dans de l'eau chaude ou froide pour obtenir des solutions dont la viscosité s'étend de quelques centipoises à plusieurs centaines de centipoises.

La viscosité va dépendre de la concentration du polymère et de sa masse moléculaire : plus celles-ci augmentent, plus la viscosité croît.

La forme et la rigidité de la macromolécule déterminent également le comportement rhéologique de la solution obtenue.

Le caractère pseudo-plastique des alginates module également la viscosité : les alginates sont des macromolécules déformables qui, déployées, peuvent en tournant, balayer un volume important, ce qui conduit à une forte gêne à la mobilité.

Lorsque le cisaillement augmente, les molécules se déforment et s'orientent progressivement dans le sens du cisaillement : la gêne à la mobilité se réduit, la viscosité diminue.

De façon prépondérante, la viscosité de la solution obtenue va dépendre du type d'alginate utilisé ; la figure 32 compare les viscosités obtenues avec différents alginates pour des concentrations identiques en agent gélifiant (les mesures sont effectuées à 25°C).

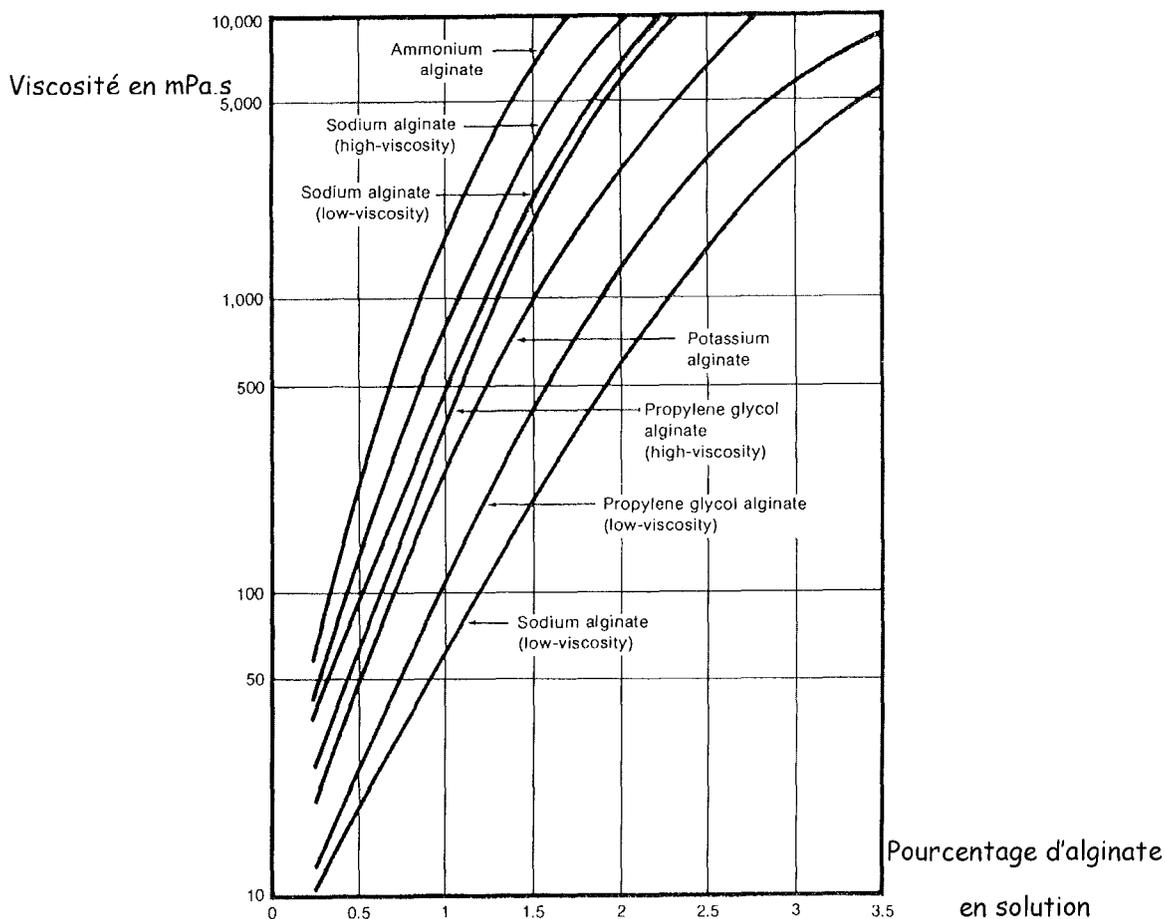


Figure 33 : Variations de la viscosité selon le type d'alginate en solution et en fonction de la concentration de l'agent gélifiant [Colwell et coll., 1984].

2.3. STABILITE

2.3.1. Stabilité des alginates

[Draget, 2000]

Une poudre sèche d'alginate de sodium a une durée de conservation de plusieurs mois si elle est stockée au sec, au frais et à l'abri de la lumière.

Par contre, un acide alginique sec a une stabilité très limitée aux températures ordinaires du fait de l'existence de dégradations catalytiques intramoléculaires.

Ainsi, la viscosité d'une solution d'un même alginate peut être très diminuée dans une courte période du fait de l'existence de phénomènes de dégradation.

De plus, les alginate étant des substances naturelles, beaucoup de microorganismes sont capables de les digérer.

Pour ce qui est du pH, la dégradation est minimale autour de la neutralité.

Néanmoins, même autour de la neutralité, la dégradation peut être observée : la plupart des algues brunes contiennent des composés phénoliques qui sont extraits en même temps que l'alginate. Ceux-ci représentent une contamination dans la plupart des alginate commerciaux.

La dégradation des alginate en solutions peut être diminuée en réduisant la quantité de phénols présents : ceci est possible en les rendant insolubles avant extraction par ajout de formaldéhyde.

2.3.2. Stabilité des solutions et gels

[Desprairies, 2002] [Colwell et coll., 1984] [Robin, 1996]

a. Influence de la température

Les gels d'alginate sont **thermoirréversibles**.

La viscosité des solutions d'alginate diminue quand la température augmente, mais si la haute température n'est pas maintenue longtemps, ce phénomène sera réversible.

On observera une dépolymérisation partielle si les solutions sont exposées à une température excessive ou une température plus modérée pendant une longue période.

Les alginate dépolymérisés ont alors un comportement rhéologique presque Newtonien (tension de cisaillement proportionnelle à la vitesse de cisaillement ; viscosité constante quel que soit le cisaillement).

La figure ci-dessous présente le comportement de trois types d'alginate soumis à une élévation de température :

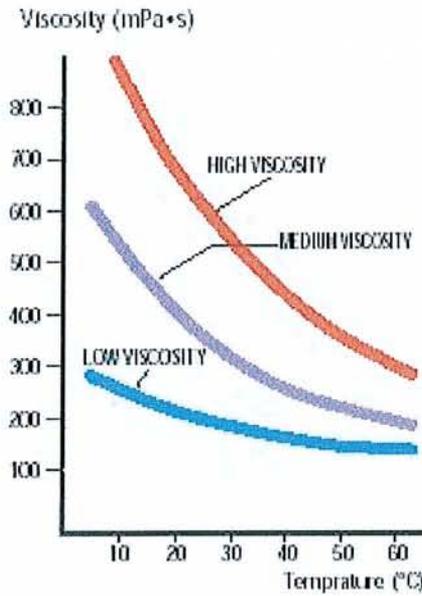


Figure 34 : Influence de la température sur la viscosité des solutions d'alginate. [b]

b. Influence du pH

Dans le cas de l'acide alginique, la viscosité est indépendante du pH si celui-ci est de 5 à 10, mais en dessous de 4.5, la viscosité augmente jusqu'à ce que le pH atteigne 3, moment où l'acide alginique insoluble va précipiter.

A pH très basique, l'alginate de sodium forme un gel. L'alginate de propylène glycol est soluble et stable entre pH 2 et 3 mais pas au-dessus de pH 6.5.

La figure suivante nous présente l'influence du pH sur trois types d'alginate : alginate de sodium à 1,5% et 2% ainsi que sur un alginate de propylène glycol à 2%.

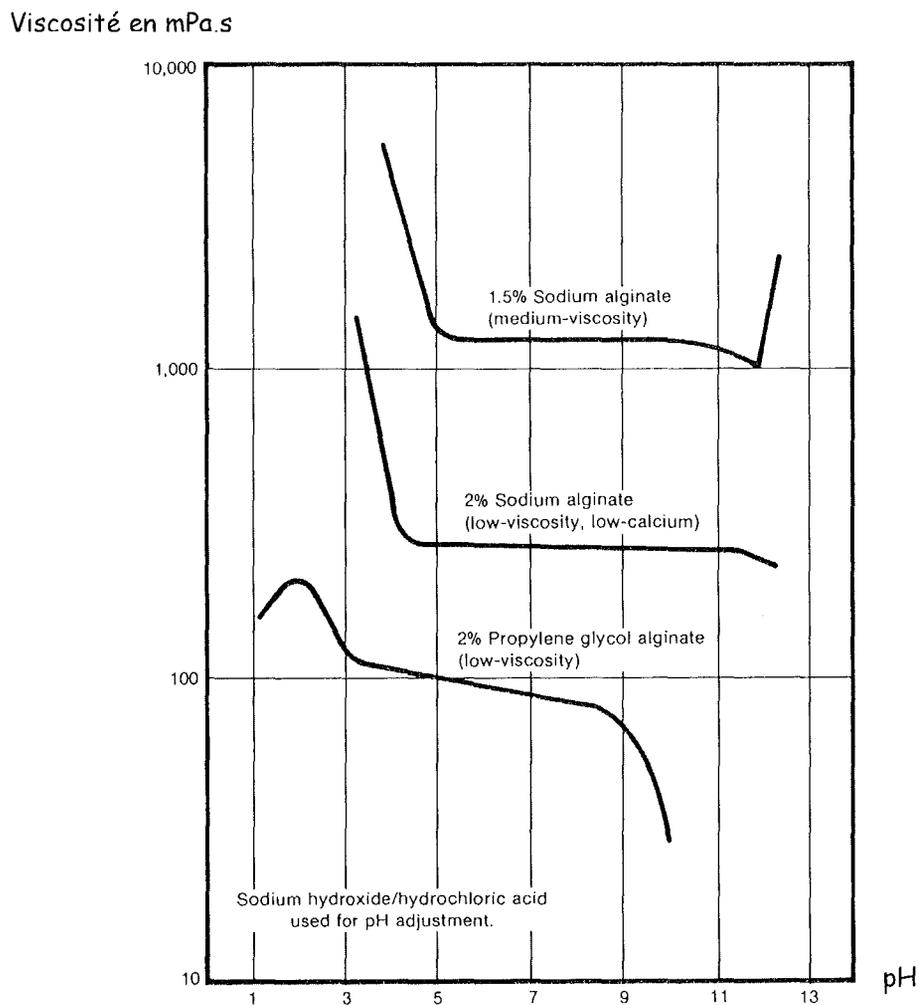


Figure 35 : Influence du pH sur la viscosité des solutions obtenues

[Colwell et coll., 1984]

c. Evolution temporelle après gélification (aging)

[Favre, 2004] [Draget et coll., 2001]

Un gel étant une structure loin de l'équilibre, divers processus peuvent apparaître après gélification, induisant des modifications structurelles et/ou fonctionnelles.

Le mécanisme le plus courant se traduit par une contraction (shrinking), avec pour effet un rejet de solvant du réseau (de l'ordre du pourcent sur plusieurs semaines).

Ce phénomène, qualifié de **synérèse**, peut traduire la poursuite de la réaction de condensation ou de réticulation au-delà du point de gélification, ainsi que les réarrangements structuraux associés.

Cette compaction progressive du réseau dépend fortement des conditions de gélification et reste difficile à prévoir quantitativement.

Les expériences menées à ce sujet par Draget et coll. ont pu montrer que le phénomène de synérèse dans les gels d'alginate de calcium dépend du poids moléculaire de l'alginate mais aussi du degré de flexibilité du polymère.

Ainsi, le degré de synérèse est réduit d'un facteur 2 quand le poids moléculaire diminue de 320 à 50 kDa (pour des concentrations identiques en polymère et en calcium).

De même en augmentant la flexibilité du polymère (par épimérisation des régions polymannuronate en régions alternant les séquences guluronate/mannuronate en utilisant la C5 mannuronan épimérase=AlgE4), on s'est aperçu que l'augmentation de la flexibilité des chaînes conduit à un plus haut degré de synérèse.

2.4. GONFLEMENT

[Skaugrud, 1995]

En présence d'un excès de solvant, un gel absorbe des molécules de solvant jusqu'à atteindre un équilibre de gonflement qui est tel que le potentiel chimique du solvant dans la phase gel est égal à celui du solvant pur.

Le réseau du gel d'alginate contient en partie des segments raides constitués par les blocs G liés entre eux par des segments flexibles que sont les blocs M et les séquences alternées M-G.

Les propriétés de gonflement du gel reflètent en fait les capacités d'expansion de ces segments de liaisons.

Un autre facteur important va être le gradient osmotique existant entre le gel et le milieu environnant ; s'il est contrôlé, le gel peut jouer le rôle de "pompe osmotique".

Ce sont ces effets qui sont mis à profit lorsqu'on utilise les alginate en tant que désintégrant dans la formulation de comprimés. (partie IV § 2.3)

NB : Problème de stérilisation : [Draget, 2000]

La stérilisation des solutions ou poudres d'alginate provoque presque toujours des phénomènes de dépolymérisation, diminution de viscosité et même de diminution de la force de gel.

Les procédés de stérilisation tels que l'autoclave, l'oxyde d'éthylène ou les rayons gamma provoquent des altérations importantes ; on recommande alors une filtration stérilisante lorsque celle-ci est nécessaire (immobilisation cellulaire par exemple).

3. CONCLUSION

[Draget, 2000] [Kloareg, 1984]

Les principales propriétés de l'acide alginique sont de permettre :

✓ d'épaissir très fortement les solutions aqueuses par ses sels d'ions monovalents tels que Na^+ , K^+ , Li^+ , NH_4^+ , $(\text{CH}_2\text{-CN-O})_3\text{NH}^+$ avec des concentrations relativement faibles.

✓ de produire des gels, soit des gels durs avec des cations bivalents et trivalents (Ca^{++} , Fe^{++} , Al^{+++} , Cu^{++} , Mg^{++} , Ba^{++} , Ni^{++} , Be^{++} , Hg^{++} , Sr^{++}), soit des gels souples en milieu acide.

✓ de donner des films protecteurs ou des filaments par évaporation.

Ainsi, on a vu que la gélification des alginate n'est pas contrôlable par une modification de la température, mais que la triade alginate-calcium-séquestrant permet de moduler de façon presque infinie les propriétés du gel ou de la solution visqueuse formés.

Les facteurs les plus importants sont donc la concentration de l'alginate, sa composition chimique, le ratio ions gélifiants/ions non gélifiants, mais aussi la présence de séquestrants.

Le schéma suivant illustre l'importance de cette triade dans le phénomène de gélification.

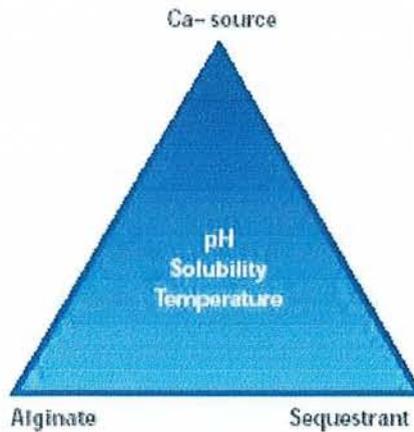


Figure 36 : Paramètres influençant la viscosité des solutions d'alginate. [b]

De plus, il ne faut pas oublier que les alginates sont des polyélectrolytes ; dans des conditions favorables, ils peuvent donc établir des interactions électrostatiques avec d'autres polymères chargés (protéines par exemple) ; il en résulte alors une possible transition de phase ou une augmentation de la viscosité.

Il apparaît donc que les alginates présentent des propriétés viscoélastiques remarquables. Ces propriétés sont très variées, parce qu'elles dépendent non seulement des propriétés intrinsèques de la molécule telles que l'ossature covalente, mais aussi de la présence d'ions et d'autres composés capables d'induire des transitions conformationnelles, qui modifient, souvent de manière réversible, la structure des solutions.

La stabilité des alginates dans des limites étendues de pH et de salinité et leur compatibilité avec de nombreuses molécules organiques ou minérales font que leurs utilisations sont aujourd'hui très diverses.

Dans la quatrième partie de ce document qui suit, nous nous intéresserons aux multiples usages envisageables des alginates, et plus particulièrement à leur rôle d'excipient dans les formes pharmaceutiques.

PARTIE IV

LES ALGINATES EXCIPIENTS

1. LES ALGINATES : UN PRODUIT OFFICINAL

Les alginates sont utilisés en tant qu'épaississants, gélifiants, stabilisants, réducteurs de cristaux, protecteurs et homogénéisants.

L'alginate de sodium officinal est un colloïde très stable, utilisé en solution de 1 à 3% comme épaississant et/ou stabilisant des suspensions.

L'alginate de sodium est employé dans les médicaments pour épaissir ou pour maintenir des particules en suspension. L'alginate propylène glycol est utilisé pour stabiliser les suspensions acides.

1.1. DÉNOMINATIONS ET RÉFÉRENTIELS UTILISÉS

[Pérez, 1992] [Schmitt, 1986] [c]

L'acide alginique est un produit officinal ; il est inscrit à la Pharmacopée Européenne.

L'acide alginique et ses sels ont une dénomination standardisée : chacun de ces additifs possède un code permettant de l'identifier dans les formules de fabrication.

Les correspondances officielles sont les suivantes :

Acide alginique = E400

Alginate de sodium = E401

Alginate de calcium = E403

Alginate de potassium = E402

Alginate d'ammonium = E404

Alginate propylène glycol = E405

Les alginates vendus en tant qu'excipients pour spécialités pharmaceutiques sont testés et certifiés conformes aux monographies de la Pharmacopée Européenne et du National Formulary.

(cf. Annexe 2 : Extraits de la Pharmacopée Européenne)

1.2. SPECIALITES CONTENANT DES ALGINATES

Dans ce paragraphe, nous citerons exclusivement les produits contenant des alginates utilisés en tant qu'excipients.

1.2.1 Acide alginique

De nombreuses spécialités (nombreuses formes sèches) aujourd'hui en contiennent, parmi lesquelles :

ACTICARBINE cp.	FASIGYNE 500 mg cp.	PREVISCAN 20 mg cp.
ADREXAN 40 mg cp.	HALDOL 1 mg cp.	PROPANOLOL RATIO 40 mg cp.
APAROXAL 100 mg cp.	HALIVITE 5% crème	SPASMAVERINE 40 mg cp.
AVLOCARDYL 40 mg	LOGRYX 100 mg cp.	TERCIAN 100 MG, 25 mg cp.
CANTABILINE 400 mg cp.	LUMIRELAX 0,5 g cp.	VASCUNORMYL 200 mg cp.
COMBANTRIN 125 mg cp.	MESTACINE 100 mg cp.	VERRULYSE-METHIONINE cp.
DIPIPERON 40 mg cp.	PINDIONE 50 mg cp.	VOGALENE 15 mg gél.

1.2.2 Alginate de sodium

Les spécialités concernées sont des formes pâteuses, mais également des comprimés à libération prolongée.

ALOPLASTINE pâte	ISOPTINE 240 mg cp.	VERAPAMIL GNR 240 mg cp.
ARTHRODONT 1% pâte	LYSOFON 0,0125% pâte	VERAPAMIL MERCK LP 240
CALMIPHASE crème	TARKA LP 180 mg/2 mg gél.	ET 120 mg cp.
HALIVITE 5% crème		VITATHION granulé eff.

1.2.3 Autres alginates

[d]

Dans ce paragraphe sont regroupés les autres types d'alginates utilisés en pharmacie ; leur utilisation est moins répandue que pour l'acide alginique et l'alginate de sodium précédemment cités.

- Alginate de calcium et sodium : MELLERIL 100 mg cp
- Alginate de triéthanolamine et de sodium : BIAFINE émulsion pour application cutanée
- Alginate de calcium et d'ammonium : LARIAM 250 mg comprimés quadrisécables
- Alginate de magnésium : TOPAAL suspension buvable
- Alginate de propylène glycol : QUESTRAN 4g poudre orale

2. UTILISATION DES ALGINATES DANS LES FORMES

SECHES

[c]

Les sels d'alginates peuvent être utilisés seuls ou en association avec d'autres polymères pour contrôler la libération de principes actifs dans l'organisme à partir de comprimés à matrice hydrophile. L'influence du pH sur les sels d'alginate permet de différer la libération des substances actives. Dans cette application, les alginates en association avec d'autres polymères sont utilisés à des concentrations de moins de 20% et entre 20 et 50% lorsqu'ils sont utilisés seuls.

2.1. COMPRIMES A LIBERATION PROLONGEE

Les propriétés physico-chimiques des alginates en font des excipients de choix dans les comprimés pour assurer une libération prolongée des principes actifs.

La raison la plus évidente justifiant de cette utilisation est leur capacité à former des hydrocolloïdes en milieu aqueux à pH acide. Comme dans l'estomac, cette membrane gonflée fait alors office de barrière de diffusion diminuant la migration de la substance active s'échappant du comprimé.

Les études menées par Onsoyen sur la libération contrôlée de comprimés de vérapamil ont permis d'étudier de manière plus détaillée le rôle des alginates mis en œuvre. [Onsoyen, 1995]

Les expériences ont été menées à pH 1,2 (reproduisant les conditions de l'estomac) et à pH 7,5 (conditions de l'intestin grêle).

Du fait des pKa différents des résidus mannuronate et guluronate, les vitesses d'hydratation dans l'estomac des alginates riches en blocs M et des alginates riches en blocs G sont différentes ; l'effet modulateur sur les comprimés en tant que barrière de diffusion sera donc différent selon l'alginate utilisé.

A pH acide, les alginates riches en blocs M ne permettent pas une hydratation aussi importante que les alginates riches en blocs G. On peut donc dire qu'à pH acide, les comprimés contenant des alginates riches en résidus mannuronate retiennent presque deux fois plus les principes actifs que ceux contenant des alginates riches en blocs guluronate.

Pour ce qui est des alginates bactériens, on a pu montrer qu'ils retiennent plus les substances actives que les alginates algaux pour des comprimés exposés à des conditions similaires à celles rencontrées dans l'intestin.

2.2. UTILISATION DANS LES SYSTEMES FLOTTANTS

2.2.1. Comprimés flottants à faible densité

[Couvreur, 1985]

Un des concepts de réalisation des systèmes flottants repose sur leur faible densité par rapport à celle du suc gastrique. Le comprimé est constitué du mélange homogène d'un ou plusieurs principes actifs avec des polymères hydrophiles. Au contact du suc gastrique, les particules d'hydrocolloïde de la partie externe du comprimé s'hydratent et forment une barrière qui accroît la dimension du comprimé, tout en maintenant sa forme et en évitant sa désagrégation. Par la suite, cette couche hydratée se dissout lentement, libérant ainsi les substances pharmacologiquement actives.

Les alginates font partie des hydrocolloïdes pouvant être utilisés dans la préparation de ces systèmes flottants.

On notera que les hydrocolloïdes constituent 20 à 75 % de la préparation selon les cas.

La flottabilité de ces comprimés résulte de la combinaison de deux phénomènes : l'augmentation de volume lors du contact avec le milieu de l'estomac et le volume poreux maintenu au sein du comprimé non hydraté, dépendant partiellement de la force de compression.

Les schémas suivants présentent simplement le mécanisme d'action d'un comprimé gastrique flottant (a) et d'un comprimé bicouche flottant (b) :

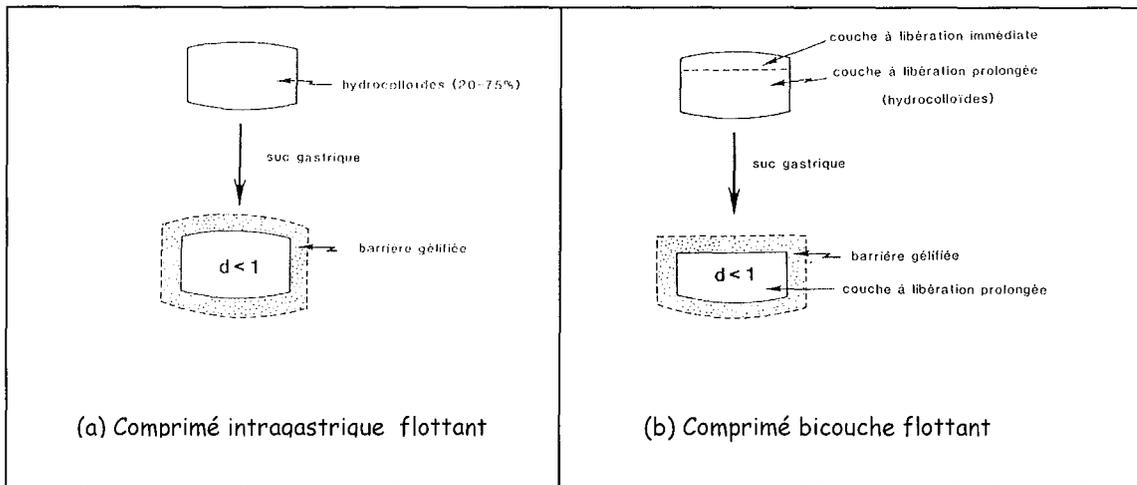


Figure 37 : Mécanisme de libération prolongée d'un comprimé intragastrique flottant (a) et d'un comprimé bicouche flottant (b) [Couvreur, 1985].

2.2.2 Capsules flottantes à faible densité

Les auteurs qui ont développé les comprimés flottants ont également breveté ce principe pour les gélules. L'approche de Stockwell et coll. décrit une flottabilité due à un dégagement de CO_2 . La libération du contenu de la gélule est contrôlée par formation de bulles de dioxyde de carbone dans un hydrogel : l'hydrocolloïde utilisé est l'alginate de sodium qui se gélifie dans le milieu acide de l'estomac, en présence de calcium.

Après dissolution de l'enveloppe de gélatine, il y a hydratation et gélification de l'alginate, ainsi que réticulation par le calcium (présence de phosphate de calcium dans la formule). Le bicarbonate de sodium (également dans la formule) en contact avec le suc gastrique, crée un dégagement effervescent de CO_2 , dont les bulles restent piégées dans le réseau gélifié, ce qui aboutit à une capsule flottante.

Dans une phase initiale, une fraction du principe actif est libérée rapidement, puis un contrôle s'instaure dès la gélification. Après 7 heures, le gel est encore rigide.

Le diagramme ci-dessous présente la cinétique de libération de la chlorphéniramine à partir de systèmes gélifiés contenant de l'alginate de sodium en proportions différentes.

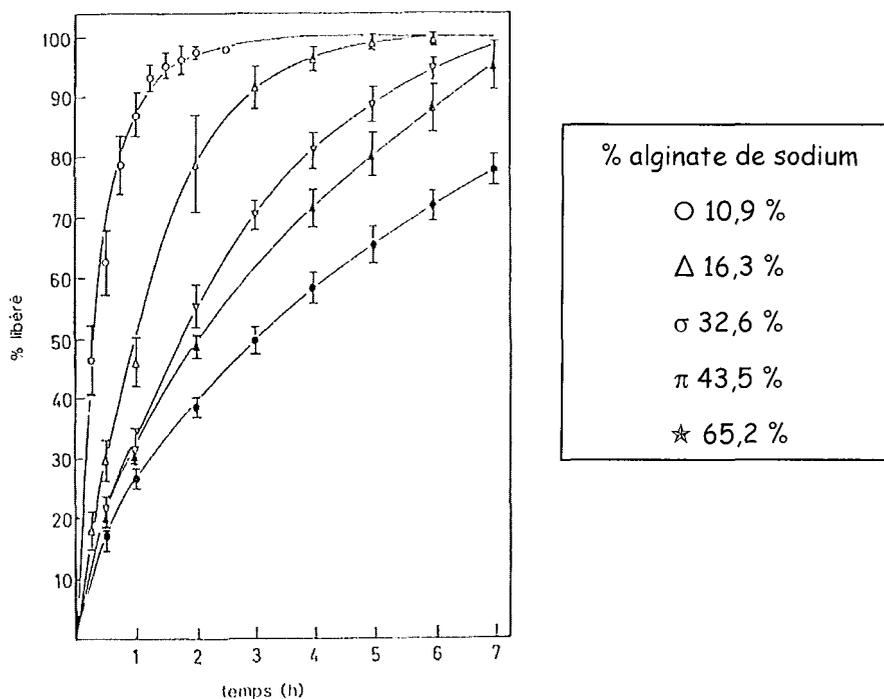


Figure 38 : Cinétique de libération de chlorphéniramine à partir de systèmes gélifiés renfermant différents pourcentages d'alginate de sodium. [Couvreur, 1985]

2.3. AGENT DESINTEGRANT

[Schmitt, 1986] [Ansel et coll., 1999] [c]

L'acide alginique est insoluble dans l'eau, mais il s'hydrate considérablement, jusqu'à cent fois son volume initial. Cette propriété en fait un agent désintégrant dans les comprimés, c'est-à-dire qu'il permet de casser une masse solide (le comprimé) en particules plus petites et plus faciles à disperser ou dissoudre.

Il est plus cher que les agents traditionnels comme l'amidon mais il est plus efficace et son coût par rapport à celui du comprimé est négligeable car il en faut très peu, beaucoup moins que l'amidon.

L'alginate de sodium possède également ces propriétés.

L'agent désintégrant est ajouté pendant la phase de granulation. L'acide alginique est tout aussi efficace en compression directe que lors d'une granulation humide.

L'acide alginique est efficace à des concentrations de 2% et plus ; des concentrations de 10% sont utilisées dans la formulation de comprimés effervescents.

Les alginates permettent ainsi une mise en suspension ou une dissolution du principe actif améliorant ainsi la biodisponibilité pour l'organisme.

2.4. AGENT LIANT

[Ansel et coll., 1999]

L'acide alginique est utilisé en tant qu'agent liant dans les comprimés : c'est-à-dire qu'il est capable d'induire l'agrégation des particules de poudres lors de la phase de granulation.

En facilitant la cohésion des particules entre elles, ces adjuvants permettent de diminuer la force de compression à appliquer à une poudre pour obtenir un comprimé de dureté suffisante pour résister aux autres opérations de la fabrication, du conditionnement, du transport et du stockage. De plus, la réduction de la force de compression réduit le temps de délitement. L'acide alginique est mélangé à l'eau pour obtenir un gonflement maximum puis est incorporé aux autres composants pour les lier ; dans le cas de principes actifs instables en milieu aqueux, on incorporera l'acide alginique à sec.

3. UTILISATION DES ALGINATES DANS LES FORMES LIQUIDES ET PATEUSES

3.1. EXCIPIENTS EPAISSISSANTS ET STABILISANTS

[Ansel et coll., 1999] [Schmitt, 1986] [c]

L'acide alginique et l'alginate de sodium peuvent être utilisés pour augmenter la viscosité : ils permettent ainsi de changer la consistance d'une préparation en la rendant plus résistante à l'écoulement ; on peut également les inclure à des suspensions afin d'en limiter les phénomènes de sédimentation, à des solutions ophtalmiques pour augmenter le temps de contact ou à des crèmes topiques afin de les épaissir.

Les alginates solubles peuvent être utilisés pour les préparations destinées à l'usage externe : ils permettent d'épaissir les pommades, gelées et glycérolés. Ils présentent l'avantage d'offrir un large éventail de consistance et d'être intégralement absorbés par l'épiderme.

Les propriétés d'étalement sont bonnes, mais les nombreuses incompatibilités limitent leur utilisation en thérapeutique.

Les meilleurs résultats en tant qu'agent épaississant ou stabilisant de suspensions sont obtenus pour des concentrations de 0,3 à 2% ;

Les alginates propylène glycols sont des stabilisants et émulsifiants convenables pour des systèmes à pH bas : des concentrations de 0,25 à 2% permettent alors d'obtenir des émulsions et suspensions stables.

Les solutions d'alginates ont un excellent pouvoir lubrifiant, ce qui explique leur utilisation dans la formulation de gels pharmaceutiques. En général, des concentrations en alginate de sodium de 2 à 5% et en ions calcium de 0,02 à 0,05% permettent d'obtenir des formules stables qui s'étalent facilement.

3.2. APPLICATIONS EN THERAPEUTIQUE ET EN COSMETOLOGIE

[Mautrait, Raoult, 1997]

A titre d'exemple de l'utilisation d'alginate de sodium, la formule d'une préparation magistrale utilisée en tant que base pour les gels cosmétiques et médicamenteux est détaillée ci-après :

Gel à l'alginate de sodium :

Formule :

Alginate de sodium	5,0g
Glycérine	5,0g
Benzoate de sodium	1,0g
Eau purifiée	89,0g

Mode opératoire : à froid, au mortier, en évitant les grumeaux.

Caractéristiques :

- anionique
- incompatibilité avec les acides forts, les alcools de plus de 30%, les sels de métaux lourds, les sels de calcium, les cationiques.
- compatibilité : avec l'ichtyol par exemple

Les alginates entrent également dans la formule de différents dentifrices : [d]

- ARTHRODONT® 1% pâte gingivo-dentaire
- LYSOFON® 0,0125% pâte dentifrice
- HOMEODENT® pâte dentifrice

3.3. INSERTS POUR LE TRAITEMENT DE LA SECHERESSE OCULAIRE

Il a été démontré que 30% de la population souffre de sécheresse oculaire. Chez les personnes présentant ce syndrome, des études menées sur la composition du liquide lacrymal ont montré des taux d'EGF (Epidermal Growth Factor) inférieurs à ceux rencontrés chez les individus sains. On a donc cherché à développer un système substitutif permettant d'atteindre des concentrations physiologiques pendant plusieurs heures.

Les expériences menées à ce sujet par Koelwel et coll. envisagent l'utilisation d'inserts matriciels délivrant la substance active de façon prolongée au niveau du cul-de-sac conjonctival.

[Koelwel et coll., 2002]

Différents types d'alginates ont pour cela été utilisés.

Du point de vue de la biocompatibilité, il semble qu'aucun des individus traités n'a manifesté d'irritation de la cornée ou de la conjonctive ni même d'effet secondaire.

De plus, la faible perte de poids mesurée sur les implants suggère que ceux-ci restent stables pendant toute la durée d'application.

Ainsi, les résultats de biocompatibilité obtenus sur des volontaires sains sont très prometteurs mais n'ont actuellement abouti à la mise sur le marché d'aucune spécialité pharmaceutique.

4. ALGINATES ET ENCAPSULATION

[Bowersock, Hogenesch, 1997] [Bowersock et coll., 1996] [Sun, 1993]

Depuis une dizaine d'années, on envisage l'utilisation de l'encapsulation dans de nombreuses applications : encapsulation de cellules modifiées ou non, d'oligonucléotides, de principes actifs dont on veut contrôler la libération.

On a même réalisé, sur des souris, des essais de vaccination par voie orale en administrant des microcapsules d'alginate de sodium renfermant des antigènes.

L'encapsulation cellulaire permet d'envisager le traitement de nombreuses déficiences (enzymatiques, hormonales ou métaboliques) sans avoir recours à un traitement immunosuppresseur ; le but est en effet de minimiser les risques de rejet.

En modifiant les cellules, on peut par exemple assurer la synthèse d'anticorps monoclonaux au sein d'un système clos : la capsule.

Les conditions de gélification des alginates étant très douces, c'est-à-dire qu'il n'est pas nécessaire d'avoir recours à des solvants ou à des hautes températures, cela permet d'utiliser les gels d'alginate pour encapsuler tous types d'antigènes sans risquer de dénaturer les épitopes. Il en est de même pour les fragments d'ADN et les principes actifs médicamenteux fragiles. Ceci permet donc d'envisager de nombreuses applications médicales dont nous expliciterons quelques exemples dans la suite de ce document. (§ 4.2. et 4.3.)

L'alginate de sodium utilisé en tant qu'agent encapsulant requiert des concentrations de 1 à 3% dans la solution.

4.1. LES PROCÉDES D'ENCAPSULATION

4.1.1. Description des procédés

[Algorithme, 2002] [Lévy, Poncelet, 1994] [Finch, 1993] [King, 1995]

La fragilité des composés biologiques a fortement restreint les techniques d'encapsulation utilisables.

Pour comprendre facilement ces techniques, il est intéressant de diviser la fabrication des capsules en deux étapes. La première consiste à disperser en fines gouttelettes la préparation à encapsuler.

Dans une deuxième étape, on réalise l'encapsulation proprement dite, c'est-à-dire que les gouttes seront enfermées dans une membrane ou solidifiées par gélification.

La première étape est mise en œuvre par extrusion ou émulsification. Le choix de l'une ou l'autre des approches est conditionné par les objectifs de productivité et de caractéristiques des billes (taille et dispersion de taille).

L'extrusion consiste à faire tomber goutte à goutte la solution (ou la suspension) à encapsuler dans un bain, où est réalisée la gélification des gouttes ou la formation d'une membrane autour de ces gouttes.

Les microcapsules formées par simple extrusion sont sphériques et de taille homogène de l'ordre de 2 à 3 mm. On peut réduire la taille des gouttes jusqu'à quelques micromètres par application d'une force additionnelle à la gravité. Les trois méthodes les plus courantes sont l'entraînement de la goutte par un flux coaxial d'air, l'application d'une force électrostatique sur la goutte et la rupture d'un jet liquide par une vibration. La méthode du goutte à goutte a aussi été modifiée pour permettre une coextrusion de la solution à encapsuler et d'une solution polymère devant former la membrane de la microcapsule.

Historiquement, la polymérisation interfaciale fut la première méthode proposée pour l'encapsulation de composés biologiques.

Une solution contenant le matériel à encapsuler, est dispersée dans une phase organique à laquelle on ajoute un dichlorure d'acide, liposoluble.

Ces deux composés réagissent à l'interface pour former une membrane autour de chacune des gouttes de phase aqueuse.

Après filtration et lavage, on récolte des microcapsules sphériques à membrane semi-perméable, résistante et très fine (200 nm).

A l'origine, la formation de ce type de membrane se réalisait à pH très basique en présence de solvant comme le chloroforme. L'adaptation à des applications biotechnologiques a été nécessaire de façon à travailler à des valeurs de pH plus faibles (≈ 8).

C'est ainsi que la diamine a été remplacée par un polysaccharide, et la réticulation interfaciale des polymères donne des microcapsules particulièrement intéressantes puisque leur biodégradabilité peut être modulée pour libérer leur matériel à différents niveaux du tube digestif.

Les conditions de fabrication sont aussi adaptables ce qui permet par exemple une production proche de la neutralité : ce procédé est exploité avec succès en cosmétologie (Collasphères®).

Au-dessus d'un millimètre, l'extrusion en régime vibratoire est la technique industrielle de choix. Entre 500 et 1000 μm , l'extrusion est favorisée pour des productions réduites et l'émulsification pour des volumes plus importants. En dessous de 500 μm , l'émulsification est la technique incontournable.

Les caractéristiques des billes produites dépendent non seulement de la technologie mise en œuvre mais également de l'alginate utilisé.

Selon la taille des particules obtenues, on utilisera différentes dénominations :

- Macrocapsules pour des diamètres supérieurs à 5000 μm
- Microcapsules pour des tailles de 0,1 à 5000 μm
- Nanocapsules pour des diamètres inférieurs à 0,1 μm

Pour produire des billes avec reproductibilité, il est nécessaire d'utiliser des alginates présentant les spécifications suivantes :

- contenir environ 70% de sels d'acide guluronique
- contenir des blocs d'acide guluronique de degré de polymérisation moyen supérieur à 15
- avoir une masse moléculaire supérieure à 240 000.

Pour des applications biomédicales, il existe des alginates ultrapurs qui sont de plus stériles et apyrogènes.

4.1.2. Production industrielle de billes d'alginate

[Lévy, Poncelet, 1994]

L'équipe de Neufeld et Poncelet a proposé une méthode basée sur la dispersion d'une solution d'alginate contenant un composé insoluble de carbonate de calcium dans une huile végétale.

La gélification est provoquée par addition d'acide acétique à l'émulsion. La méthode est facilement extrapolable à l'échelle industrielle même pour des billes de petite taille. La chute de pH associée au procédé (de 8 à 6,5 dans les conditions optimales) peut néanmoins constituer une limite pour certains types de cellules.

La majorité des hydrogels est d'origine naturelle. Ils posent le problème de reproductibilité des lots et de la présence de composants mineurs pouvant avoir des effets négatifs, surtout pour les applications médicales. Le succès de nombreuses applications des microcapsules dépend donc du bon contrôle des propriétés et de la pureté du matériel de base.

4.2. ENCAPSULATION D'ACTIFS

[Couvreur, 1985]

L'association d'une molécule active à un vecteur de médicaments permet d'envisager une réduction du champ d'activité au site choisi. Elle permettrait de corriger le profil de distribution tissulaire et de l'affranchir des propriétés physico-chimiques de la molécule qui régissent généralement la répartition entre les divers organes.

Les molécules médicamenteuses peuvent être inactivées avant d'atteindre le site d'action. Leur protection peut s'effectuer par le recours à des particules ou vésicules microdispersées susceptibles de prévenir la dégradation du principe actif.

Les vecteurs de médicaments doivent être sélectionnés en fonction de leur aptitude à établir un lien suffisamment stable avec le médicament, afin d'éviter une libération prématurée. La liaison doit toutefois être réversible au niveau du site d'action afin de permettre la libération. Les vecteurs utilisés doivent donc être également biodégradables et ne doivent pas induire la formation de métabolites toxiques.

De plus, une bonne tolérance par voie intravasculaire va impliquer des formulations ultrafines, la taille des éléments dispersés ne pouvant être supérieure au micron.

Les nanocapsules ou nanoparticules à base de polymères présentent l'avantage d'être plus stables que les liposomes et leur préparation industrielle est plus simple.

L'encapsulation de molécules actives permet d'envisager plusieurs avantages dont les principaux sont :

- une meilleure spécificité d'action
- une pénétration intracellulaire accrue
- une protection éventuelle contre une inactivation prématurée de la molécule active.

4.3. ENCAPSULATION DE CELLULES

[Lévy, Poncelet, 1994] [Whateley, 1996]

La première tentative d'encapsulation de cellules vivantes fut réalisée en 1966 : la technique consistait en une réticulation in situ d'un gel de polyacrylamide. Mais la présence de monomères résiduels conduisait à une toxicité non négligeable. En 1977, la découverte d'une technique de formation de billes d'alginate permet de débiter réellement l'encapsulation de cellules vivantes.

Les billes sont simplement produites en laissant tomber goutte à goutte une solution d'alginate dans une solution de chlorure de calcium, à température ambiante, pH et osmolarité physiologiques.

Mais les billes préparées ont deux inconvénients :

- faible productivité de la méthode d'extrusion et contrôle complexe pour les petites tailles de billes.
- reliquéfaction des billes en présence d'ions complexant le calcium tels que les phosphates.

La transplantation de cellules de mammifères encapsulées dans des membranes biocompatibles et semi-perméables a un grand potentiel pour le traitement de maladies nécessitant la suppléance en enzymes ou le remplacement de certaines cellules déficientes.

4.3.1. Transplantation d'îlots de Langerhans encapsulés

[Draget, 2000] [Sun, 1993] [Thu et coll., 1996]

Malgré l'intérêt du traitement du diabète par des injections d'insuline, des morts prématurées de patients diabétiques dues aux complications chroniques de la maladie sont constatées. Depuis une vingtaine d'années, différents systèmes destinés à l'administration contrôlée d'insuline aux diabétiques ont été décrits dans la littérature.

L'intérêt considérable que présenterait un "pancréas bioartificiel implantable" délivrant de l'insuline à la demande est clairement compris. Le principe est basé sur l'isolation et la purification de cellules pancréatiques endocrines et leur encapsulation dans des systèmes assurant la diffusion par le biais d'une membrane semi-perméable.

Chez le singe, on a pu contourner la réponse immunologique grâce à l'encapsulation d'îlots de Langerhans dans des capsules semi-perméables et biocompatibles d'alginate-polylysine.

Les îlots encapsulés sont d'origine porcine ; on peut ainsi suivre le taux de peptide C porcin chez le receveur.

Chaque capsule contient un îlot et a un diamètre de 0,25 à 0,35 millimètres.

On a pu ainsi montrer l'importance de la taille des capsules dans la cinétique de libération de l'insuline : des capsules de petite taille permettent d'augmenter la viabilité des cellules (accès plus facile à l'oxygène et aux nutriments), la rapidité de réponse aux fluctuations de la glycémie, mais également de les rendre moins susceptibles aux dégradations.

La transplantation intrapéritonéale des îlots a pour conséquences la normalisation de la glycémie, une cétonurie négative chez le primate, et cela sans apport exogène d'insuline et sans traitement immunosuppresseur.

Cette normalisation a duré pendant plus de 300 jours après la transplantation.

Toutefois, la capture des capsules d'alginate par les phagocytes et les fibroblastes a été constatée.

Deux problèmes limitent aujourd'hui l'étude clinique sur l'homme :

- le choix de l'origine des îlots transplantés
- les problèmes liés au système immunitaire (§ 4.4.1.)

Néanmoins, la microencapsulation et la transplantation d'îlots pancréatiques semblent une approche prometteuse dans le cadre du traitement du diabète de type I et de ses conséquences.

4.3.2. Microencapsulation d'hépatocytes

[Sun, 1993]

Les thérapies habituellement utilisées pour le traitement des hépatites fulminantes n'obtiennent qu'un taux de survie de 10 à 20 %. De même dans ce cas, une greffe hépatique ne mène qu'à 50 % de rémission.

Les études menées par Sun et coll. se sont orientées vers l'utilisation d'hépatocytes encapsulés en tant qu'organe artificiel dans le traitement des hépatites fulminantes.

Les cellules hépatiques ont été encapsulées dans des membranes d'alginate-polylysine. Les hépatocytes transplantés ont été obtenus à partir de cultures réalisées sur des foies de rats sains.

On a réalisé une transplantation intrapéritonéale sur des rats chez qui on a induit une hépatite fulminante.

Par rapport au groupe témoin n'ayant reçu que des capsules vides, on constate chez le groupe ayant reçu les cellules encapsulées une amélioration marquée des taux de survie à 7 et 14 jours. Chez ce même groupe, on observe une régénération progressive du foie.

Les résultats de cette étude suggèrent que des allogreffes d'hépatocytes encapsulés permettraient de suppléer un foie dont le fonctionnement est altéré par des toxines, des médicaments ou des maladies aiguës.

4.3.3. Microencapsulation de cellules recombinantes

[Sun, 1993] [Whateley, 1996]

Dans le traitement des maladies endocrines, métaboliques et génétiques, la cause est très souvent l'absence ou le dysfonctionnement d'un gène.

On veut alors apporter à la cellule le gène déficient, mais on se heurte alors jusqu'ici à des phénomènes de rejet par le système immunitaire.

Ainsi, on a envisagé de réintroduire des cellules génétiquement modifiées (après une manipulation *in vitro*) chez le donneur lui-même.

On a encapsulé les cellules génétiquement modifiées dans des membranes d'alginate-poly-L-lysine. Cela a permis d'éviter les processus de rejet et d'assurer une libération entretenue du gène recombinant après transplantation.

Des études menées sur la souris ont été réalisées : on a transformé des fibroblastes de souris en leur transfectant le gène de l'hormone de croissance humaine. Les fibroblastes modifiés ont été encapsulés dans une membrane d'alginate-poly-L-lysine puis transplantés chez les souris receveuses.

On a pu constater que les souris ayant reçu le gène humain présentaient des niveaux détectables de l'hormone humaine dans leur sérum pendant plus de 100 jours.

Cette étude chez l'animal a ainsi permis de montrer qu'il est possible de produire à long terme la protéine recombinante faisant défaut.

L'avantage de ce système est la facilité avec laquelle on peut moduler la quantité de protéine délivrée dans l'organisme en modifiant le nombre de capsules utilisées pour la transplantation.

Ce type de système semble très utile dans le traitement de nombreuses maladies où la libération continue d'une protéine manquante est nécessaire : maladies endocrines, métaboliques...

De même, une autre application de l'encapsulation cellulaire est la production d'anticorps monoclonaux. Les cellules d'hybridomes, produisant les anticorps monoclonaux, sont intégrées dans des microcapsules : les nutriments et l'oxygène nécessaires sont mis à disposition et peuvent entrer par le biais d'une membrane semi-perméable. Les anticorps monoclonaux synthétisés par les cellules encapsulées restent à l'intérieur des microcapsules dans lesquelles ils s'accumulent à une concentration plus grande que celle obtenue sans encapsulation. Pour récupérer les anticorps, les microcapsules sont extraites du milieu de culture et détruites.

A l'heure actuelle, les anticorps monoclonaux sont utilisés dans le traitement de maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn (influximab REMICADE®), les lymphomes (rituximab MABTHERA®) et les phases aiguës d'infarctus du myocarde (abciximab REOPRO®).

Compte-tenu du coût élevé de ces traitements dûs notamment aux faibles rendements obtenus, on voit ici tout l'intérêt de développer des procédés, tels que la microencapsulation, permettant d'améliorer ces rendements.

4.3.4. Microencapsulation de cellules de la parathyroïde

[Sun, 1993]

On a longtemps envisagé des greffes de parathyroïdes visant à prévenir les hypocalcémies à long terme chez les patients ayant subi une parathyroïdectomie secondaire à un adénome ou une hyperplasie.

L'obstacle majeur rencontré dans la transplantation tissulaire est toujours le problème de rejet par le système immunitaire.

Encouragés par le succès de la transplantation d'ilôts de Langerhans, Sun et coll. ont envisagé de la même façon l'encapsulation de cellules de parathyroïde.

Les cellules ont donc été encapsulées dans des membranes d'alginate-polylysine qu'on a ensuite injectées par voie intrapéritonéale chez des rats ayant subi une parathyroïdectomie.

Trois jours après la transplantation, les concentrations en calcium et en hormone parathyroïde (PTH) dans le sérum avaient augmenté jusqu'à des valeurs quasi-normales chez le rat receveur.

Cette étude a permis de montrer l'utilité des capsules semi-perméables dans les systèmes de libération d'hormones à long terme.

D'autres études faisant appel aux alginates pour l'encapsulation ont également été menées, notamment dans le cadre de la recherche d'un traitement de la maladie de Parkinson, mais également dans les dysfonctionnements des glandes surrénales.

Malgré les problèmes qui restent encore non résolus aujourd'hui, ces techniques de microencapsulation, et notamment l'encapsulation des ilôts de Langerhans, semblent présager d'un avenir prometteur.

4.4. AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES ALGINATES EN ENCAPSULATION

4.4.1. Réaction du système immunitaire

[Hardikar et coll., 1999] [Skaugrud, 1995] [Draget et coll., 1997]

Quelle que soit la voie d'administration, l'administration de microcapsules à base d'alginate se heurte aux réactions du système immunitaire.

On a pu montrer que l'induction du TNF (Tumor Necrosis Factor) et de l'interleukine 1, tous deux cytokines à activité pro-inflammatoire, semble dépendre du contenu en mannuronate dans l'échantillon d'alginate. Les fragments riches en mannuronate, n'étant pas impliqués dans la formation du réseau du gel, déclenchent la réponse immunitaire. Ainsi, on a montré que les alginates polymannuroniques stimulent la production de certaines cytokines (IL-1, IL-6, TNF) alors que les alginates riches en unités guluroniques semblent inhiber cette stimulation.

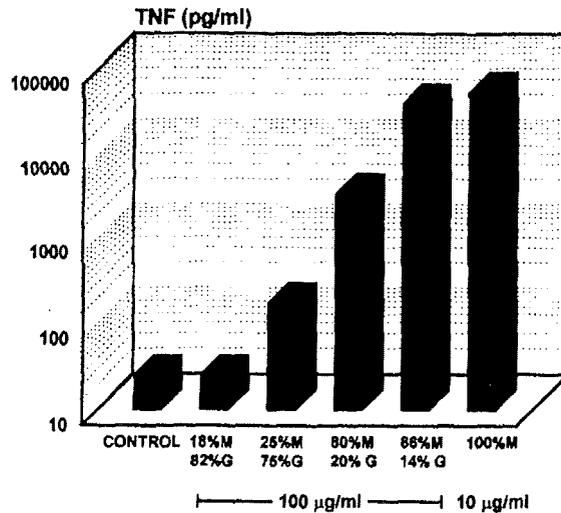


Figure 39 : Production de TNF (Tumour Necrosis Factor) en réponse à des alginates contenant différentes proportions d'acides mannuroniques. [Draget et coll., 1997]

Les recherches menées par Bowersock et Hogenesch ont permis de montrer que la capture des microparticules par les plaques de Peyer dépend de l'hydrophobicité des microparticules.

Pour augmenter l'hydrophobicité et ainsi stabiliser les microsphères dans le milieu acide de l'estomac, ils ont donc proposé d'enrober les microparticules avec la poly(L-lysine).

De même, les expériences menées par Hardikar et coll. sur des souris chez qui on a transplanté des îlots de Langerhans encapsulés dans des microbilles constituées d'une matrice alginate-chitosane, ont montré l'intérêt d'une telle association pour contrer un éventuel rejet par le système immunitaire. Le chitosane a un effet inhibiteur sur la croissance des fibroblastes.

Aujourd'hui, pour prévenir les risques de rejet par le système immunitaire, sont commercialisés des alginates "ultrapurs" dont le rapport M/G a été spécifié pour maximiser la biocompatibilité ; ces alginates subissent une filtration stérilisante (0,22 µm) et garantissent un faible taux d'endotoxines.

4.4.2. Cytotoxicité

[Aynié et coll., 1997]

Jusqu'ici, lorsqu'on souhaitait vectoriser des oligonucléotides antisens dans des nanoparticules, on se heurtait très fréquemment à un problème de cytotoxicité des agents encapsulants : c'est le cas lorsqu'on utilise le polyisohexylcyanoacrylate (PIHCA) et un ammonium quaternaire en tant que surfactant cationique.

En revanche, des nanoparticules d'alginate réalisées en stabilisant les particules d'alginate de calcium par la poly(L-lysine) semblent être moins cytotoxiques.

De plus, ces systèmes offrent une plus grande capacité de charge en oligonucléotides (20 µmol/g contre seulement 5 µmol/g pour le système précédemment décrit).

4.5. PERSPECTIVES

Aujourd'hui, les connaissances acquises en matière de gels d'alginates sur les phénomènes de gonflement et leur cinétique, ainsi que sur leurs propriétés mécaniques et physico-chimiques permettent d'entrevoir la possibilité d'élaborer des "alginates sur mesure". Il semble en effet qu'une maîtrise parfaite des propriétés du gel utilisé va permettre d'envisager la reproductibilité des systèmes de libération contrôlée et des effets thérapeutiques consécutifs à leur utilisation.

On considère maintenant de plus en plus les alginates comme des polymères hémi-synthétiques dont on peut contrôler les qualités lors du procédé d'extraction : c'est très certainement la principale raison pour laquelle les alginates (mais aussi d'autres biopolymères) suscitent un intérêt grandissant dans les domaines médicaux et pharmaceutiques.

PARTIE V

ETUDES EXPERIMENTALES

RÉTICULATION CHIMIQUE DE GELS
D'ALGINATE

Les travaux de recherche présentés dans cette dernière partie ont pour objet la réticulation chimique de gels d'alginate. L'agent réticulant retenu est une molécule bivalente (diamine) qui présente l'intérêt de pouvoir envisager un dosage permettant d'évaluer le taux de jonction dans le gel. Les mises au point du protocole de réticulation et de la méthode de dosage, ainsi que les phénomènes de partage dans ces gels ont été abordés. On a également cherché à comparer les propriétés des gels obtenus avec des gels réticulés par le calcium.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une thèse portant sur l'étude et la modélisation des phénomènes de diffusion dans les gels d'alginate.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. LES PRODUITS DE DÉPART

1.1.1. L'alginate

L'alginate de sodium utilisé lors des différentes expériences a été fourni par la société SIGMA® (Alginic acid, Sodium Salt, Medium Viscosity). Cet alginate est issu de l'algue *Macrocystis pyrifera* et appartient au lot 111K0005. Une analyse par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de lumière aux petits angles fournit des masses molaires moyennes de 300 000 g/mol.

Le pourcentage d'humidité de cette poudre d'alginate de sodium a été évalué à 9 % en masse environ (au début de notre étude expérimentale).

a. Caractérisation structurale par dichroïsme circulaire

[Morris et coll., 1980] [Rastello, 2002]

Le dichroïsme circulaire est une méthode d'analyse spectrophotométrique qui combine le phénomène de polarimétrie et celui de l'absorption de la lumière par la matière permettant ainsi la **visualisation de la dissymétrie d'une molécule** en solution.

Une onde lumineuse monochromatique à polarisation rectiligne est la résultante d'une onde lumineuse à polarisation circulaire droite et d'une onde lumineuse à polarisation circulaire gauche. Lorsqu'un milieu est optiquement actif, son indice de réfraction est différent suivant qu'il est traversé par des lumières polarisées droite et gauche (n_D et n_G).

En d'autres termes, dans un milieu optiquement actif, le rayonnement circulairement polarisé à droite se déplace à une vitesse différente de celui polarisé à gauche, étant donné que l'indice de réfraction traduit la vitesse de la lumière dans un milieu. Ce phénomène, appelé **biréfringence circulaire** est utilisé en dichroïsme circulaire où la solution contenant la molécule à étudier est éclairée par une lumière polarisée.

Le dichroïsme circulaire utilise également une caractéristique des molécules dissymétriques, optiquement actives : leur absorption différente des deux composantes droite et gauche du faisceau lumineux.

La résultante de ces deux phénomènes de biréfringence circulaire et d'adsorption différente conduit à un faisceau émergeant non plus polarisé circulairement mais elliptiquement pour lequel l'ellipticité va dépendre à la fois : des coefficients d'extinction moléculaire pour les lumières polarisées à la longueur d'onde λ , de la concentration C et de la longueur du chemin optique L .

Le dichroïsme circulaire peut être utilisé pour caractériser la structure chimique de l'alginate. En effet, les trois types de blocs présents ont des spectres dichroïques différents : le spectre du poly-L-gulonate est entièrement négatif, celui du poly-D-mannuronate est positif et celui des zones alternées est intermédiaire mais non équivalent à celui d'un mélange équimolaire des deux types de blocs précédents.

La méthode proposée par Morris et coll. permet alors d'interpréter les spectres des alginate en terme de rapport M/G . Cette méthode consiste à mesurer le rapport des hauteurs p et t , p correspondant au pic positif relatif et t au pic négatif. Les courbes de corrélation proposées par ces mêmes auteurs relient le rapport M/G au rapport p/t .

La figure 40 présentée page suivante donne le spectre de dichroïsme circulaire de l'alginate utilisé dans le cadre de notre étude.

Dans le cas présent, nous avons montré par dichroïsme circulaire que le rapport M/G de l'alginate utilisé au cours de cette étude est égal à 1,45 ($p/t=0,72$).

D'après les courbes de corrélation (cf. figure 41), l'alginate de sodium utilisé contient environ 59 % de résidus β -D-mannuronate et 41 % de résidus α -L-gulonate.

Ces pourcentages sont conformes à ceux habituellement mesurés pour des alginate ayant pour origine *Macrocystis pyrifera*.

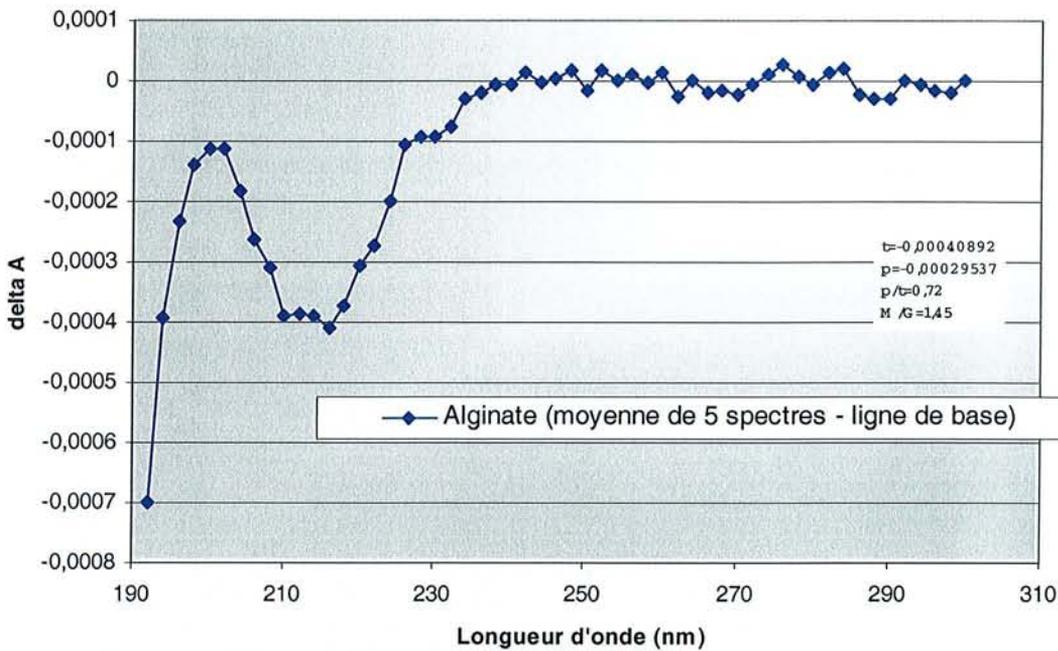


Figure 40 : Spectre de dichroïsme circulaire de l'alginate de sodium utilisé pour notre étude.

La figure suivante donnant les courbes de corrélation nous a permis de caractériser le lot d'alginate de sodium utilisé dans nos études expérimentales.

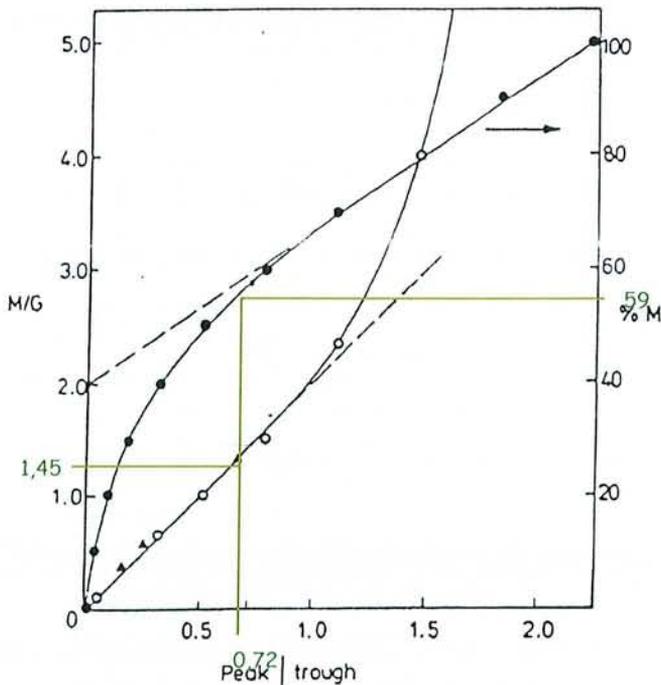


Figure 41 : Courbes de corrélation entre le rapport M/G des dérivés mannuronate et guluronate d'un échantillon d'alginate de sodium et le rapport des intensités p/t. [Morris et coll., 1980]

b. Caractérisation structurale par hydrolyse

[Bouffar-Roupe, 1989]

La part des différents types de blocs G et M a également été déterminée par hydrolyse enzymatique partielle réalisée au CERMAV (Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales) à Grenoble. Cette méthode permet d'avoir une information sur la longueur des blocs mannuronique et guluronique ainsi que sur la structure des zones alternées.

Deux types de lyase sont utilisées : une lyase spécifique des liaisons α -L-guluronique qui dégrade les blocs G et une lyase spécifique des liaisons β -D-mannuronique qui s'attaque aux liaisons des blocs M.

Les résultats fournis par le CERMAV donnent un rapport M/G de 1,80 environ.

Pour les alginates provenant des algues *Macrocystis pyrifera*, le rapport moyen M/G trouvé dans la littérature est de l'ordre de 1,6. [Ertesvag, Valla, 1998].

1.1.2. Le pullulane

[Mc Carthy, 1993]

Le pullulane est un polysaccharide biodégradable décrit pour la première fois en 1959. C'est un glucan extracellulaire neutre synthétisé par *Aureobasidium pullulans*, plus communément appelé *Pullularia pullulans*.

La structure du pullulane consiste de façon prédominante en une succession d'unités maltotriose liées par des liaisons α -1,6 glycosidiques.

Comme la cellulose et la pectine, le pullulane est un polysaccharide non digestible.

Tout comme l'amidon, sa dégradation thermique débute approximativement à 250°C, puis il carbonise et ne génère alors ni fort dégagement de chaleur, ni gaz toxique.

Le fournisseur de ce polysaccharide est Polymer Laboratories ; au départ, ce polymère est commercialisé sous forme de kit de calibration pour les chromatographies par perméation sur gel. Pour nos études de coefficients de partage, l'intérêt d'avoir choisi ce polysaccharide est que la plage des masses molaires disponibles pour ce composé est importante ; en effet, ce kit comprend des masses molaires variant de 180 à 788 000 g/mol. De plus, les pullulanes utilisés présentent une grande monodispersité et appartiennent à une même famille d'homologues permettant ainsi d'avoir une interaction matrice-soluté constante.

1.2. MISE EN FORME DES GELS D'ALGINATE

Deux géométries de gels physiques (c'est-à-dire réticulés par le calcium) d'alginate ont été utilisées pour l'ensemble des expériences effectuées : gels sous forme de boudins ou de billes.

1.2.1. Préparation des solutions

a. Solution de NaCl/CaCl₂ 0,1M

Toutes les réticulations calciques effectuées sont réalisées en présence de chlorure de sodium, ceci permet en effet de maintenir une force ionique constante, et ainsi d'obtenir des gels assez homogènes. En effet, lors de la formation des gels, le calcium pénètre au sein du gel en cours de formation ; en contrepartie, des molécules d'eau migrent en sens inverse afin de contrebalancer la charge amenée par les ions calcium. Ces molécules d'eau entraînent avec elles des chaînes d'alginate qui se retrouvent préférentiellement en périphérie. La conséquence est une répartition inhomogène des molécules d'alginate au sein du gel, ce qui constitue un élément critique pour l'étude de la diffusion au travers de ces entités.

En préparant les solutions d'alginate avec du NaCl 0,1M, on évite ce type de problème.

La solution de NaCl/CaCl₂ 0,1M est préparée comme suit :

- Peser la masse de poudre voulue de CaCl₂ et NaCl
- Ajouter de l'eau distillée jusqu'au volume voulu.

Pour les masses molaires, prendre celles indiquées sur les flacons fournisseurs.

b. Solution d'alginate de sodium

- Peser précisément la poudre d'alginate de sodium avec une balance de précision
- Ajouter une solution de NaCl 0,1 M
- Placer 24 heures sous agitation vigoureuse dans un flacon étanchéifié avec du parafilm.

Une agitation efficace est nécessaire afin de garantir la totale dissolution de l'alginate mais elle entraîne également la formation de bulles d'air qu'on laissera s'éliminer en plaçant la solution obtenue au réfrigérateur pendant 24h.

1.2.2. Formation des boudins

Il a semblé intéressant d'obtenir des boudins de gel afin d'en extraire de fines rondelles de forme appropriée aux tests de rhéologie (cf. § 1.4.).

a. Réalisation de gels physiques

On entend par gel physique les gels obtenus par réticulation calcique.

La solution d'alginate de sodium à réticuler est versée dans un morceau de membrane de dialyse (Molecularporous membrane tubing, Spectrum Laboratories) noué à son extrémité. Avant de nouer l'autre extrémité afin de fermer le boudin, on veille à éliminer les bulles d'air éventuellement présentes.

Le boudin ainsi réalisé est placé sous agitation dans une solution de NaCl 0,1M/CaCl₂ 0,1M pendant 48 heures.

b. Réalisation de gels chimiques

On appellera ici gel chimique tout gel obtenu par réticulation avec l'acide adipique dihydrazine (cf. § 1.3.).

On réalise les boudins dans des tubes Falcon dans lesquels on verse, outre la solution d'alginate à réticuler, les réactifs nécessaires à la réticulation chimique. On récupère le boudin de gel réticulé chimiquement après 72 heures d'agitation.

1.2.3. Formation des billes d'alginate

Le montage utilisé (cf. figure 42) comprend une seringue en tant que réservoir de solution d'alginate raccordée à un pousse-seringue type morphine ; un agitateur magnétique au fond du bécher évite l'accumulation des billes néoformées au même endroit (risque de colmatage des billes) ; l'aiguille utilisée a été coupée car la forme biseautée initiale ne permet pas d'obtenir des billes sphériques. La solution d'alginate extrudée à travers l'aiguille tombe dans la solution de NaCl/CaCl₂ 0,1M et fige instantanément.

On considère que la gélification est terminée 24h après l'arrêt du pousse-seringue correspondant à la formation des dernières billes.

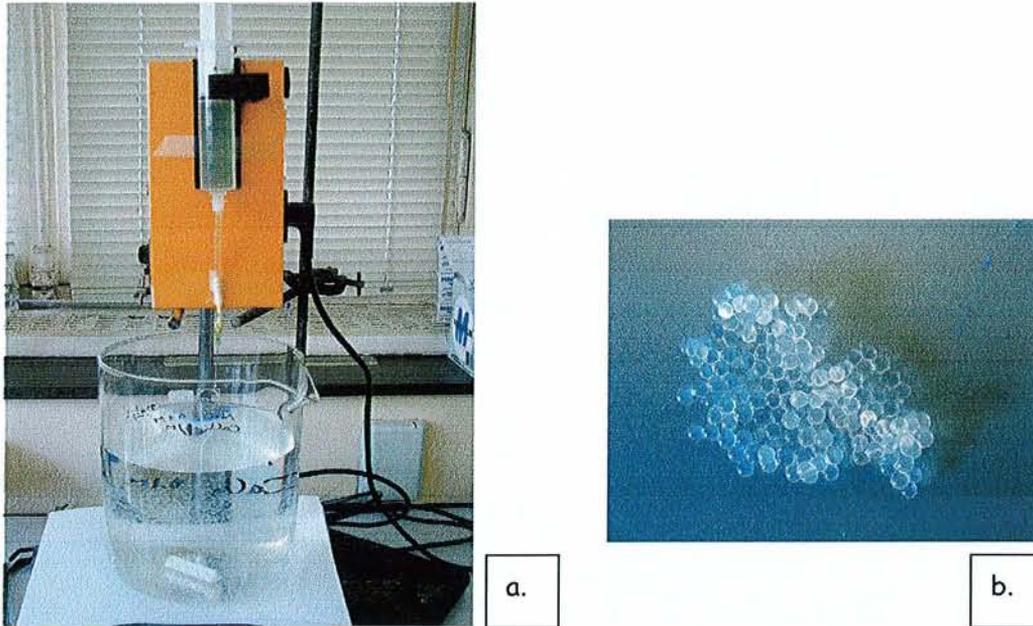


Figure 42 : Billes d'alginate de calcium

- a. Montage utilisé pour la mise en forme
- b. Photographie de billes

1.2.4. Formation des films chimiques

Compte-tenu de la faiblesse et de l'hétérogénéité des gels chimiques obtenus par réticulation dans les tubes Falcon, une autre géométrie a été envisagée : on a réalisé la réticulation dans une boîte de Pétri afin d'obtenir des films plus facilement utilisables pour les études de rhéologie. Après pesée des différents réactifs nécessaires à la réticulation (cf. § 1.3.), suivie d'une homogénéisation douce (afin de ne pas générer de bulles dans le gel), la solution est coulée dans une boîte de Pétri et laissée au repos 48h au moins avant l'étude rhéologique.

1.2.5. Détermination de la fraction massique en polymère

a. Cas des billes

Dans le but d'estimer la fraction massique en polymère dans le gel sous forme de billes, on effectue l'essai sur 50 billes. On détermine par pesée la masse de solution d'alginate versée goutte à goutte dans la solution calcique. La durée de gélification est fixée à 48h.

Au bout de 48h, les billes sont retirées de la solution calcique et filtrées sur un filtre en veillant à éliminer l'excédent de liquide entourant les billes.

Une seconde pesée permet d'accéder à la masse des billes après gélification.

Le **taux de gonflement** θ des billes sera défini par :

$$\theta = \frac{m_{t=48h}}{m_{t_0}}$$

$m_{t=48h}$ = masse des billes après 48h de gélification

m_{t_0} = masse de solution d'alginate versée dans la solution calcique pour former les 50 billes

La **fraction massique en polymère** Φ est alors :

$$\phi = \frac{\text{concentration de la solution d'alginate de départ (g/L)}}{\theta}$$

Φ s'exprime en mg de polymère/g de gel en contact avec le solvant (ici eau ou tampon MES)

b. Autre méthode applicable aux billes, boudins et films

- Laver une masse connue m de gel à l'eau distillée (4 fois pendant 48 h) ou un autre solvant
- Lyophiliser pour avoir l'extrait sec de masse m'
- La **fraction massique en polymère** Φ' est donnée par :

$$\phi' = \frac{m'}{m} \text{ en mg de polymère/g de gel en contact avec le solvant}$$

1.3. RÉTICULATION CHIMIQUE DE L'ALGINATE PAR L'ACIDE ADIPIQUE DIHYDRAZINE

Lee et al. ont réticulé un alginate poly-G avec de l'acide adipique dihydrazine ; par rhéologie, ces auteurs ont mis en évidence que les propriétés mécaniques ainsi que le taux de gonflement peuvent être contrôlés indépendamment, en fonction de la longueur de la chaîne et du degré de réticulation.

C'est cette méthode utilisant l'AAD (Acide Adipique Dihydrazine) qui a été retenue pour nos expériences. [Lee et coll., 2000]

1.3.1. Réactifs et solutions utilisés

a. Les réactifs

* **MES** = Morpholine Ethane Sulfonic acid (M=195,2) fourni par la société SIGMA® (MES hydrate 97% titration). Il servira à réaliser la solution tampon dans laquelle va être menée la réticulation chimique.

* **EDC** = 1-[3-(diméthylamino)propyl]-3-éthylcarbodiimide hydrochloride (M=191,71) fourni par la société Aldrich®. Cet agent de couplage sera utilisé dans la première phase de la réticulation chimique, afin d'initier la réaction.

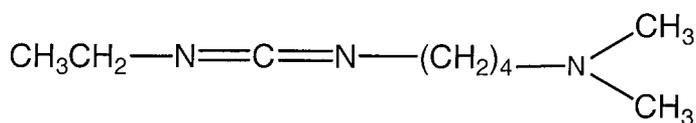


Figure 43 : Structure chimique de la molécule d'EDC.

* **NHS** = N-hydroxysuccinimide (M=115,9) fourni par la société SIGMA® et également utilisé dans la première phase de la réticulation chimique.

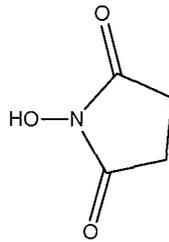


Figure 44 : Structure chimique de la molécule de N-hydroxysuccinimide.

* **AAD** = Adipic Acid Dihydrazine (M=174,2) fourni par la société SIGMA® ; cette diamine va permettre la réticulation de la molécule d'alginate par réaction sur les groupements carboxyle.

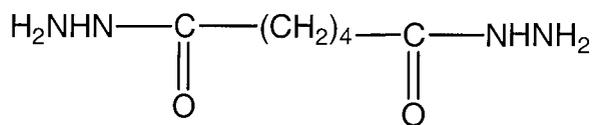


Figure 45 : Structure chimique de la molécule d'acide adipique dihydrazine. [Lee et coll., 2000]

b. Préparation des solutions

* Tampon MES/NaCl 0,1M pH6 :

- peser environ exactement les masses de MES et NaCl
- dissoudre sous agitation dans un volume d'eau distillée
- ajuster la solution à pH=6 avec une solution de soude 1M
- ajuster le volume final de façon à avoir un tampon à 0,1M de MES et NaCl

* Solution d'alginate dans le tampon MES :

- peser sur la balance de précision la masse d'alginate à dissoudre
- ajouter un volume V connu de tampon MES/NaCl pH6 de façon à avoir une concentration en alginate d'environ exactement 25g/L
- dissoudre sous agitation pendant 24h et laisser au moins une nuit au réfrigérateur

* Solutions d'EDC, NHS et AAD

- sur la balance de précision, peser exactement les masses de poudres
- diluer dans une quantité exactement connue de tampon MES

NB : les concentrations de ces trois solutions seront choisies de façon à ce que la concentration finale en alginate à la fin des étapes de réticulation chimique soit de 17 g/L.

1.3.2. Mécanisme réactionnel mis en jeu

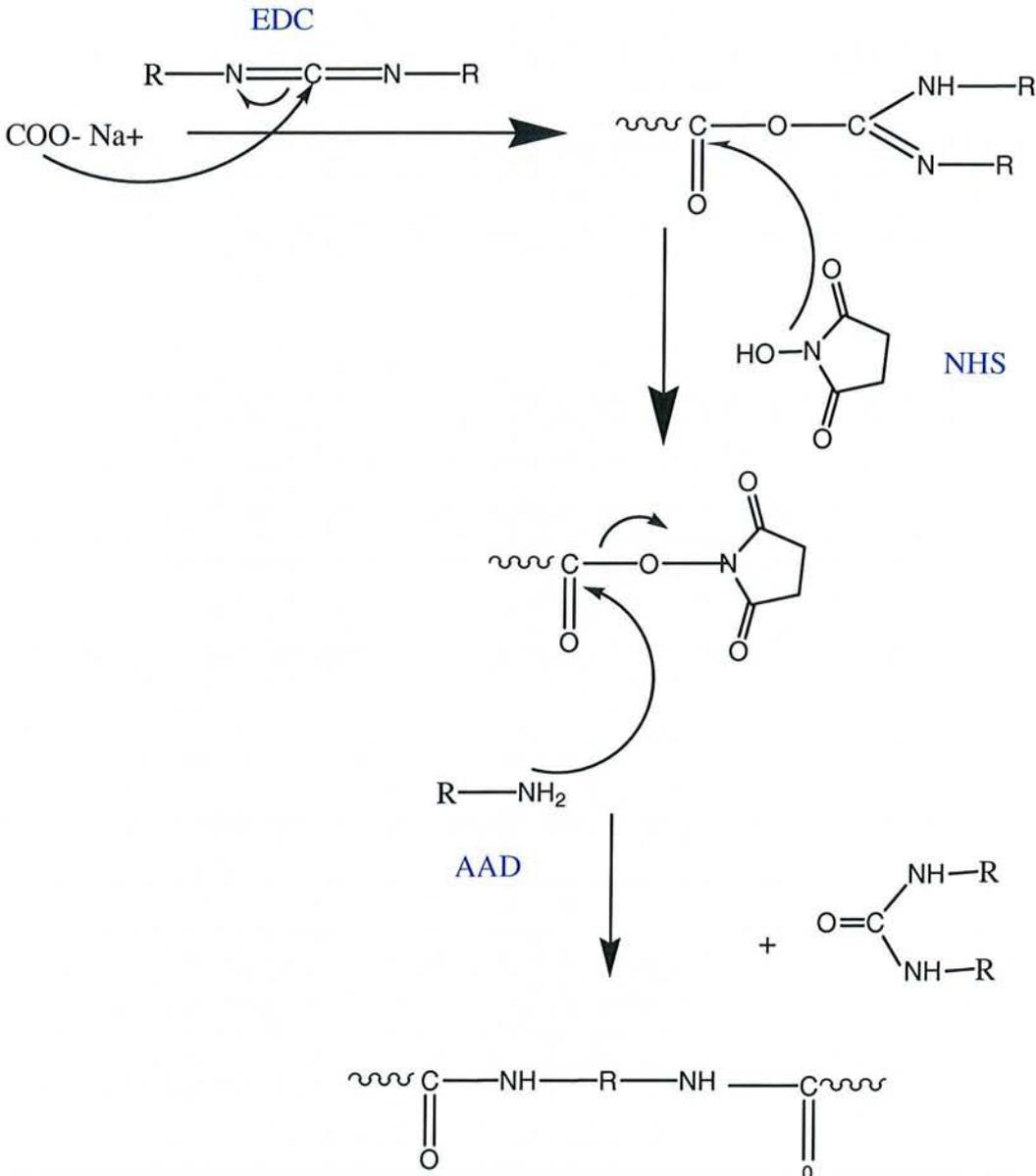


Figure 46 : Schéma du mécanisme réactionnel mis en jeu lors de la réticulation chimique par l'AAD.

La structure obtenue après réticulation chimique est représentée dans la figure suivante où un alginate poly-G a été réticulé par l'AAD :

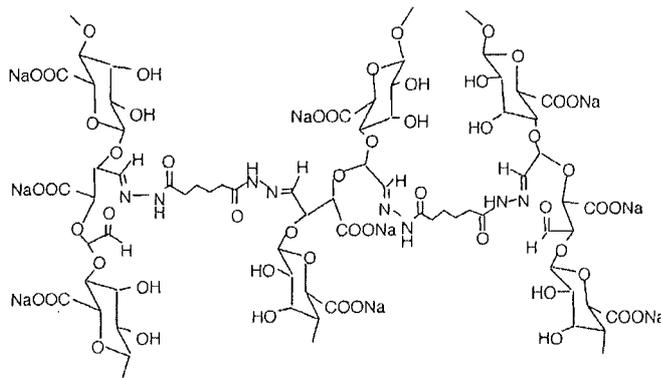


Figure 47 : Structure chimique d'un alginate poly-G réticulé par l'AAD. [Lee et coll., 2004]

1.3.3. Protocole expérimental

Ce protocole a été élaboré en s'inspirant des travaux réalisés par Lee et coll. en 2000.

Il s'applique aussi bien à la réticulation chimique de films, boudins ou billes d'alginate de sodium.

Compte-tenu de l'impossibilité de former des billes d'alginate par réticulation chimique, on réalisera la réticulation chimique sur des billes préalablement formées par réticulation calcique.

Les différentes étapes pour la réticulation de films et boudins sont récapitulées ici :

- à une masse connue de solution d'alginate à environ exactement 25g/L, ajouter les volumes exactement connus de solution de NHS puis d'EDC selon la stoechiométrie suivante : 1 mole de NHS pour 2 moles de $-COO^-$ et 1 mole d'EDC par mole de $-COO^-$.

On note que la masse molaire du motif d'alginate est de 198 g/mol.

- agiter pendant 30 minutes

- ajouter un volume exactement connu de solution d'AAD selon le taux de réticulation envisagé

- compléter avec du tampon MES au volume souhaité de façon à avoir une concentration finale en alginate de 17 g/L

- mettre sous agitation douce à température ambiante pendant 24h pour les billes, 48h pour les films et 72h pour les boudins.

- les gels obtenus sont ensuite lavés au tampon MES (4 fois en 48h)

Les gels chimiques sont obtenus en soumettant le gel à un lavage par une solution de citrate.

1.4. ELEMENTS DE RHEOLOGIE

[Bossard et coll., 2004] [Cousot, Grossiord, 2001] [Mazens, 2002] [Rastello, 2002]

1.4.1. Intérêt de l'étude rhéologique

Dans les études de diffusion, l'hypothèse d'un temps caractéristique de relaxation du réseau négligeable devant le temps de diffusion est posée par la plupart des modèles. On cherche ici à vérifier que cette hypothèse est acceptable en accédant au temps caractéristique du réseau. De plus, on souhaite visualiser les modifications du point de vue de la rhéologie éventuellement imputables à la réticulation chimique mise en jeu.

Un matériau soumis à un ensemble de forces est susceptible de se déformer. Les propriétés rhéologiques de matériaux viscoélastiques sont déterminées en cisillant les échantillons au sein de cellules de mesure axisymétriques (de type plan/plan dans notre étude) visant à reproduire au mieux des conditions de cisaillement simple. Connaissant le couple et les caractéristiques géométriques de la cellule, on peut déterminer la **contrainte de cisaillement** τ définie comme la force tangentielle par unité de surface qui s'exerce sur un élément de volume du matériau considéré.

Dans les différents tests réalisés, on s'intéresse à la **contrainte** τ et à la **déformation** γ du gel.

La figure suivante illustre plus simplement la relation contrainte-déformation :

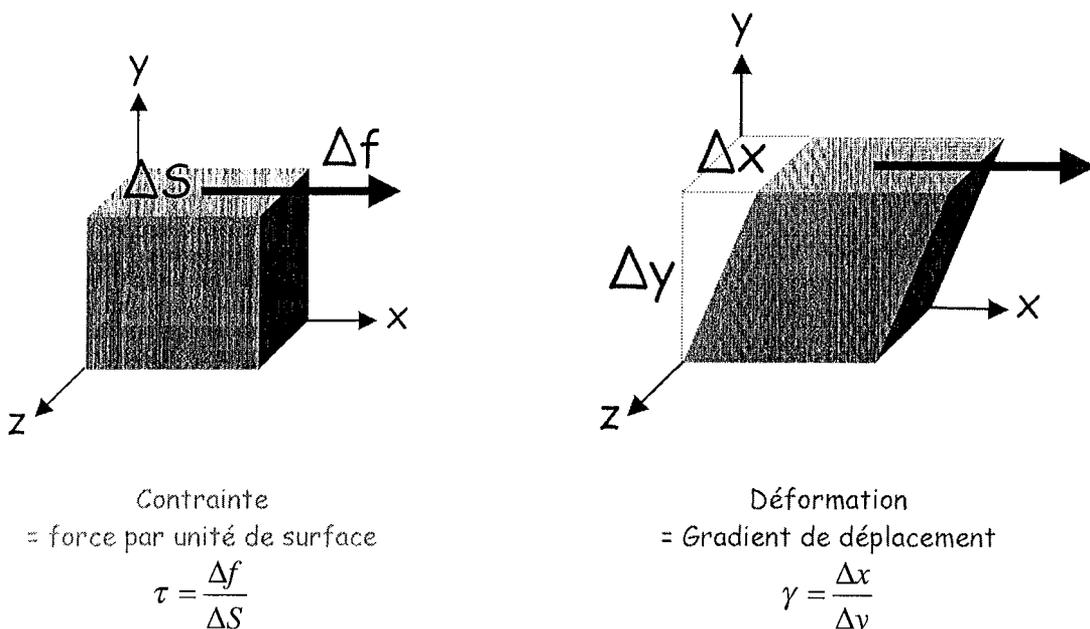


Figure 48 : Définitions : contrainte et déformation.

1.4.2. Tests mis en oeuvre

Deux types de tests ont été envisagés lors de cette étude : tests de relaxation et tests en régime oscillatoire.

a. Test de relaxation

On impose un **échelon de déformation** à l'échantillon et l'évolution de la contrainte qui en résulte est mesurée.

On obtient ainsi la **fonction de relaxation** : $G(t) = \frac{\tau(t)}{\Delta\gamma}$

On se place dans le domaine de linéarité, ce qui implique :

* à l'échelle macroscopique : τ proportionnel à γ

* à l'échelle microscopique : matériau non perturbé (solicitation mécanique faible)

Dans le domaine de linéarité, G est indépendant de la déformation et donc caractéristique du matériau et notamment de sa dynamique.

b. Test en régime oscillatoire

On impose une **déformation** et on mesure la contrainte.

On en déduit le **module complexe G^*** : $G^* = \frac{\tau}{\gamma}$

Ce module complexe est la résultante de 2 composantes : le module élastique G' et le module visqueux G'' :

* Le **module élastique G'** (ou rigidité dynamique) traduit la réponse élastique du matériau. La valeur de G' est ainsi le reflet du nombre de chaînes élastiquement actives (noté n), c'est à dire engagées entre deux ou plusieurs points de jonction formés par les associations hydrophobes intermoléculaires, et de la force des interactions mises en jeu.

G' donne donc des informations d'ordre structural.

* Le **module visqueux G''** traduit la réponse visqueuse du matériau et caractérise l'aspect hydrodynamique du système. En général, G'' est caractéristique du volume effectif du réseau polymère formé en solution par l'enchevêtrement des chaînes macromoléculaires et les associations hydrophobes.

G'' augmente avec l'expansion des pelotes polymères et augmente donc également lorsque la structure du réseau s'amplifie.

De façon générale, il est admis que le module de perte G'' reflète le volume effectif du réseau de polymère tandis que le module élastique G' caractérise la densité de points de jonction formés par des liaisons hydrophobes.

G' et G'' sont liés par l'angle de déphasage δ :

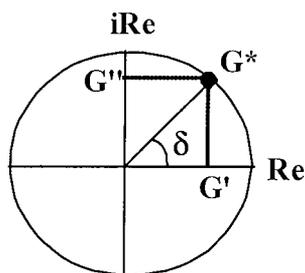


Figure 49 : Représentation schématique de G' , G'' et δ .

Le déphasage dépend du caractère élastique ou visqueux du matériau.

δ est compris entre 0 et $\frac{\pi}{2}$:

* Pour un solide hookéen (la contrainte est en phase avec la déformation), $\delta=0$

* Pour un fluide newtonien (la contrainte est en phase avec la vitesse), $\delta = \frac{\pi}{2}$

1.4.3. Choix préférentiel d'une méthode

Dans le cas du test de relaxation, il est en fait techniquement impossible d'imposer véritablement un échelon de déformation ; on aura donc des informations erronées aux temps courts ($< 0,1$ s) mais également aux temps longs si la contrainte tend vers 0 (cas des fluides viscoélastiques et gels peu réticulés). Comme τ est déterminée à partir du couple, cela va poser problème quand celui-ci va devenir inférieur à la limite de sensibilité du capteur. On aura alors recours au mode oscillatoire.

En mode oscillatoire, le problème se pose lorsqu'on étudie des gels très réticulés car plusieurs jours seraient nécessaires à l'étude de l'échantillon (relaxation aux temps longs très lente) ; il est alors plus intéressant, dans ce cas, de revenir au premier test.

1.5. METHODE DE DOSAGE DU TAUX DE JONCTION AVEC

L'AAD

1.5.1. Principe du dosage

La méthode de dosage utilisée est inspirée des travaux réalisés par les équipes de Lee et Edwards-Lévy. [Lee et coll., 2004] [Bouhadir et coll., 1999] [Edwards-Lévy et coll., 1993]

La molécule d'AAD étant bifonctionnelle, elle a la possibilité de se lier à la molécule d'alginate par une de ses extrémités, ou les deux. Pour déterminer le taux de jonction, on s'intéresse plus particulièrement aux molécules liées par leurs deux extrémités.

La technique proposée utilise le TNBS (trinitrobenzène sulfonic acid = picryl sulfonic acid) qui réagit avec l'AAD en formant un complexe soluble quantifiable par spectrophotométrie UV-visible. On pourra ainsi accéder à une quantification approximative du taux de jonction.

Les molécules d'AAD fixées par les deux extrémités ne réagiront pas avec le TNBS ; le TNBS sera donc uniquement consommé par les molécules d'AAD liées par une seule extrémité.

L'analyse élémentaire parallèlement menée sur ce même gel lavé (cf. § 1.5.3.) et lyophilisé permet d'accéder à la quantité d'AAD totale fixée dans le gel (par une extrémité ou les deux).

$$\text{Taux de jonction} = \text{AAD totale} - \text{AAD fixée par une extrémité}$$

Donnée par
quantification de
l'azote par analyse
élémentaire

Donnée par le dosage
par le TNBS

1.5.2. Préparation des solutions nécessaires au dosage

a. Tampon borate pH 8

[e]

La réaction de dosage est menée dans un tampon borate à pH 8 dont la préparation est décrite ci-dessous :

A 50,0 ml d'une solution d'acide borique et de chlorure de potassium 0,2M, ajouter 4,0 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,2M. Compléter à 200 ml avec de l'eau distillée et soumettre à agitation.

b. Solution de TNBS

Cette solution sera préparée extemporanément à partir d'une solution à 5% w/v (Sigma, France). La dilution sera réalisée dans le tampon borate pH 8 de façon à obtenir une solution à 4 $\mu\text{mol/ml}$ ($M_{\text{TNBS}} = 293,2 \text{ g/mol}$).

c. Solution d'AAD

Peser une quantité exactement connue d'AAD et la dissoudre dans une solution d'acide trichloracétique à 1% de façon à obtenir une concentration en AAD d'environ exactement 40 $\mu\text{mol/ml}$ ($M_{\text{AAD}} = 174,2$).

1.5.3. Lavage préalable des billes

Les premiers essais de dosage effectués sur les billes ont montré qu'après réticulation chimique, une grande quantité d'AAD non lié à l'alginate subsiste après lyophilisation et qu'un lavage au MES ne permet pas d'éliminer cette fraction libre d'agent réticulant.

Ainsi, il a fallu mettre au point une méthode de lavage permettant d'éliminer l'AAD libre.

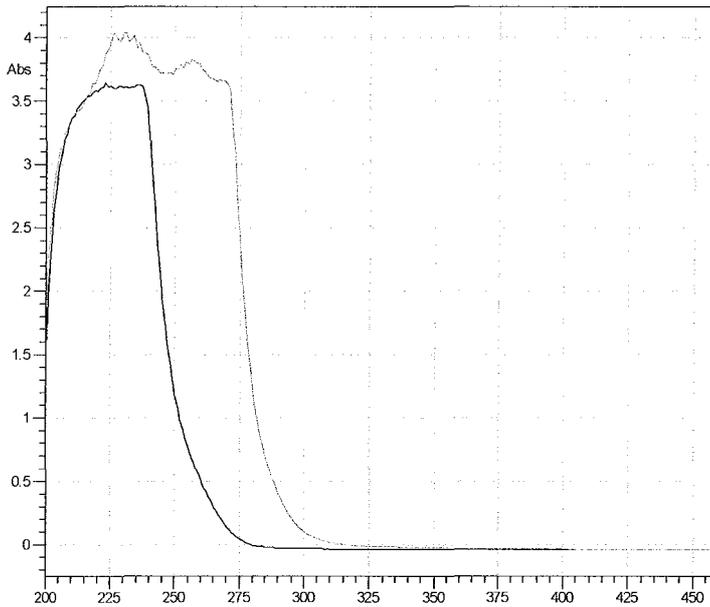
Pour cela, on s'est placé à pH basique afin d'éliminer les interactions dues à la présence d'une charge positive sur la fonction amine de l'AAD en milieu acide.

Pour la mise au point de ce lavage, nous avons mis en contact 1 gramme de billes avec une quantité exactement connue d'AAD. Après lavage avec un volume V d'une solution de NaCl 0,1M à pH 10, on a cherché à montrer que tout l'AAD mis au départ est retrouvé dans la solution de lavage.

Pour cela, on a comparé le signal obtenu en spectrophotométrie UV entre 200 et 500 nm à celui d'un témoin contenant exactement la même concentration que la solution de lavage supposée contenir tout l'AAD de départ.

Les mesures ont été effectuées contre un blanc constitué par la solution de NaCl pH 10.

Les courbes de la figure 50 ont permis de montrer que le lavage est efficace lorsque 1 gramme de billes est lavé avec 30 mL de solution de lavage. En effet, les signaux obtenus pour la solution témoin et la solution de lavage sont quasiment superposés.



Les spectres de la solution de lavage (en noir) et de la solution témoin (en rouge) sont quasiment superposés. Le lavage a permis de récupérer la majorité de l'AAD.

Figure 50 : Mise au point de la méthode de lavage des billes.

1.5.4. Protocole expérimental

a. Dosage proprement dit

Une masse connue (environ exactement 10 mg) de billes d'alginate lyophilisées préalablement lavées (selon le protocole détaillé § 1.5.3.) est mise en solution dans 3,2 ml de tampon borate à pH 8. Après 5 minutes d'agitation, environ exactement 4 ml de la solution de TNBS sont ajoutés. Après 1 heure d'incubation à l'obscurité à 37°C et sous agitation, filtrer et récupérer le filtrat. 900 µl de ce filtrat sont introduits dans un tube à essai dans lequel on ajoute ensuite 100 µl de solution d'AAD.

Le mélange est incubé pendant 1 heure à l'obscurité à 37°C. Le milieu réactionnel est ensuite acidifié avec 22 ml d'acide chlorhydrique 0,5M afin de stabiliser le complexe formé.

L'absorbance de la solution est ensuite mesurée à 327 nm contre un blanc préparé selon le protocole ci-dessus en remplaçant l'AAD par 100 µl d'acide trichloracétique à 1%.

b. Courbe d'étalonnage

La quantification du TNBS résiduel va être possible grâce à l'élaboration d'une gamme étalon mettant en jeu plusieurs dilutions de TNBS réagissant avec une quantité connue d'AAD.

900 µl de solution diluée (dans le tampon borate) de TNBS sont mis à réagir avec 100 µl de solution d'AAD pendant 1 heure à 37°C et à l'obscurité.

Les tubes sont ensuite dilués avec 16 ml d'HCl 0,5M et leur absorbance est mesurée à 327 nm contre des blancs réalisés pour chacune des dilutions (la solution d'AAD a été remplacée par 100 μ l d'acide trichloracétique à 1%).

Tube gamme	G1	G2	G3	G4	G5
Volume de TNBS à 4 μ mol/ml (μ l)	100	200	300	400	500
Volume de tampon borate (μ l)	800	700	600	500	400

Tableau 5 : Préparation de la gamme étalon permettant la quantification du TNBS.

1.6. DETERMINATION EXPERIMENTALE DES K_p

1.6.1. Définition du coefficient de partage

Après la mise en contact d'un gel gonflé de solvant et d'un composé en solution dans ce même solvant (ou lors de la mise en contact d'un liquide avec un gel contenant un composé), on assiste à un chargement (ou une libération) conduisant à l'équilibre, c'est-à-dire à l'établissement d'un partage de ce composé entre la phase liquide et la phase gel. Ce partage est caractérisé par le **coefficient de partage K_p** , qui est le rapport de la concentration massique du composé dans la phase gel sur la concentration massique dans le surnageant :

$$K_p = \frac{[Pullulane]_{gel}}{[Pullulane]_{surnageant}}$$

Ce coefficient de partage est un paramètre thermodynamique qui intervient également dans la cinétique de diffusion du pullulane dans le gel car il correspond à la situation finale obtenue en fin de cinétique de diffusion.

La méthode utilisée pour mesurer ce coefficient est la suivante :

3,75 g de gel d'alginate sous forme de billes sont mis au contact avec 4 ml de solution de pullulane à 1g/L.

Après 72h, on dosera le surnageant ainsi que la solution initiale de pullulane à 1g/L.

(On note qu'ici le solvant utilisé est une solution de MES/NaCl 0,1M).

1.6.2. Dosage du pullulane par l'anthrone

Cette technique est basée sur la réaction de l'anthrone avec les motifs glucose du pullulane qui conduit, en milieu acide chaud, à la formation d'un complexe vert quantifiable par spectrophotométrie dans le visible à 625 nm.

a. Préparation de la solution d'anthrone

Dans un bécher de 1 litre placé dans un bain d'eau froide, on introduit 1g d'anthrone et 150 mL d'eau osmosée. 350 mL d'acide sulfurique concentré sont ensuite ajoutés lentement sous agitation. L'anthrone se dissout au fur et à mesure, conduisant à un mélange visqueux de couleur jaune intense. Après homogénéisation et retour à température ambiante, la solution est stockée à 4°C et à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation (délai de 1 mois).

b. Préparation de la solution de pullulane

Le mode opératoire est le suivant :

- Peser le pullulane (poudre) avec la balance de précision
- Peser CaCl_2 0,1M /NaCl 0,1M avec précision
- Laisser 24 heures sous agitation afin que le polymère soit complètement dissout

c. Mise en contact des billes avec la solution de pullulane

- Filtrer les billes sur un filtre maille
- Peser les billes avec précision : éliminer le maximum de solvant présent autour des billes (étape importante pour évaluer précisément le coefficient de partage)
- Ajouter avec précision la solution de pullulane de concentration définie
- Laisser en contact 72 heures

d. Dosage proprement dit

100 μL de la solution de pullulane (surnageant pour les échantillons) sont ajoutés à 5 mL d'anthrone dans des tubes en verre, qui après fermeture seront homogénéisés au vortex. Les tubes sont ensuite placés dans un bain-marie à 80°C pendant 40 minutes. Après retour à température ambiante et une seconde homogénéisation au vortex, les absorbances de la gamme étalon et des échantillons sont mesurées par spectrophotométrie dans le visible à 625 nm.

Il est nécessaire d'effectuer un étalonnage simultané avec des solutions de pullulane de concentrations connues dans le milieu aqueux concerné, contre un blanc préparé avec 100 μL de solvant. La concentration en pullulane n'excèdera pas 1 g/L de façon à se placer dans la zone de linéarité de l'absorbance avec la concentration en polymère.



Figure 51 : Dosage du pullulane par l'anthrone.

Il a été vérifié au préalable que l'alginate de sodium ne réagit pas avec l'anthrone afin de s'assurer que le dosage du pullulane n'est pas perturbé par la présence de faible quantité d'alginate qui resterait dans le surnageant à doser.

Afin de pouvoir comparer de manière rigoureuse les coefficients de partage dans les gels physiques et chimiques, on appliquera cette méthode pour chacun des 10 pullulanes aux 3 types de gels de notre étude :

- * gel uniquement physique, c'est-à-dire des billes réticulées par le calcium.
- * gel mixte, c'est-à-dire des billes réticulées par le calcium dans un premier temps puis par l'AAD dans un second temps.
- * gel uniquement chimique, c'est-à-dire des billes réticulées à la fois par le calcium et l'AAD qu'on a ensuite lavé avec une solution de citrate 0,2M pH6 afin d'en extraire le calcium.

2. RESULTATS EXPERIMENTAUX

2.1. LES DIFFÉRENTS GELS RÉALISÉS

2.1.1. Type et nomenclature

Afin de mettre au point la méthode de réticulation et d'appréhender quantitativement la réaction de réticulation mise en jeu, différentes géométries de gel ont été envisagées.

Les films et boudins présentent l'avantage de pouvoir être étudiés en rhéologie ; la réalisation de billes s'inscrit dans le cadre d'une thèse consacrée à l'étude et à la modélisation des phénomènes de diffusion.

Pour la réticulation chimique, les différents taux de réticulation étudiés ont préalablement été inspirés des travaux de Lee et al. : les gels obtenus par la réticulation d'un alginate poly-G par des quantités croissantes d'AAD présentent un module visqueux qui croit puis décroît lorsque le taux de réticulation augmente, avec un maximum pour 40% d'AAD.

Les différents taux envisagés dans un premier temps ont été : 16, 20, 32 et 40%.

a. Les films

Des films mixtes (calcium + AAD) ainsi que des films chimiques (uniquement AAD) ont été étudiés.

FILM	% d'AAD	Type de gel
G1	40	mixte
G2	32	mixte
G3	20	mixte
G4	16	mixte
C2	40	chimique
C3	16	chimique
C4	20	chimique
C5	32	chimique
C6	10	chimique
C7	59,27	chimique

Tableau 6 : Présentation des films réalisés.

b. Les boudins

Cette géométrie a tout d'abord été envisagée afin d'étudier le phénomène de réticulation chimique sous l'angle de la rhéologie.

Des gels physiques (uniquement calcium), mixtes (calcium puis AAD) mais également des gels uniquement chimiques ont été réalisés.

BOUDIN	% d'AAD	Type de gel
F1	0	physique
F2	0	physique
F3	40	mixte
F4	32	mixte
F5	20	mixte
F6	16	mixte
F7	32	mixte
C1	40	chimique

Tableau 7 : Présentation des boudins réalisés.

c. Les billes

Différents lots de billes ont été réalisés : des petits lots destinés à la mise au point des méthodes de dosage et de lavage mais aussi trois lots plus importants utilisés pour les études de coefficients de partage. Il est à noter que les lots B4, B5, B6 utilisés pour les études de K_p sont issus d'un même lot de billes calciques dont on a fait 3 sous-lots à la fin de la réticulation physique.

BILLES	% d'AAD	Type de gel
B1	0	physique
B2	40	mixte
B3	40	mixte
B4	40	physique
B5	40	chimique
B6	40	mixte

Tableau 8 : Présentation des billes réalisées.

2.1.2. Fraction massique en polymère dans les différents gels

GEL	Fraction massique en polymère (mg d'AA/g de gel en contact avec solvant)	Forme	Type de gel	% AAD
G1	65,7 (eau)	film	chimique	40
G2	50,7 (eau)	film	chimique	32
G3	75,3 (eau)	film	chimique	20
G4	68,3 (eau)	film	chimique	16
F1	32,8 (eau)	boudin	physique	0
F2	32,6 (eau)	boudin	physique	0
F3	32,3 (eau)	boudin	mixte	40
F4	29,2 (eau)	boudin	mixte	32
F5	28,9 (eau)	boudin	mixte	20
F6	32,8 (eau)	boudin	mixte	16
F7	32,1 (eau)	boudin	mixte	32
B1	40,1 (eau)	billes	physique	0
B2	40,5 (eau)	billes	mixte	40
B3	49,4 (eau)	billes	mixte	40
C2	34,4 (eau)	film	chimique	40
C3	15,1 (eau)	film	chimique	16
B4	17,5(eau)/35,3(MES)	billes	physique	0
B5	49,1(eau)/74,5 (MES)	billes	chimique	40
B6	24,9(eau)/32,49(MES)	billes	mixte	40

Tableau 9 : Récapitulatif des fractions massiques en polymère dans les différents gels.

2.2. COEFFICIENT DE PARTAGE K_p :

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX - INTERPRÉTATIONS

Pour chacun des trois types de gels, on a effectué une mise en contact avec les 10 pullulanes du kit. Les gels testés ont été réticulés chimiquement en présence de 40% d'AAD.

Les résultats des calculs de coefficient de partage sont répertoriés dans le tableau suivant :

Masse molaire (g/mol)	K_p gel chimique	K_p gel physique	K_p gel mixte
180	1,21	Point aberrant	1,14
738	1,16	1,26	1,26
5900	1,34	1,35	1,35
11800	0,62	0,68	0,73
22800	0,45	0,56	0,57
47300	0,20	0,34	0,44
112000	0,02	0,09	0,20
212000	Point aberrant	Point aberrant	Point aberrant
405000	0,24	0,14	Point aberrant
788000	0,28	0,02	0,34

Tableau 10 : Coefficients de partage K_p de pullulane à différentes masses molaires pour les 3 types de gels étudiés.

NB : Une petite valeur de K_p traduit une faible aptitude à laisser entrer le pullulane ; de même, des valeurs élevées de K_p témoignent d'une facilité du polysaccharide à entrer dans les billes.

Ces résultats sont représentés sur la figure 52 page suivante.

La tendance générale pour les trois types de gels est une diminution du coefficient de partage en fonction de l'augmentation de la masse molaire du pullulane. Les pullulanes de masse molaire élevée auront beaucoup plus de mal à pénétrer dans les mailles des billes par le simple fait de leur encombrement stérique important.

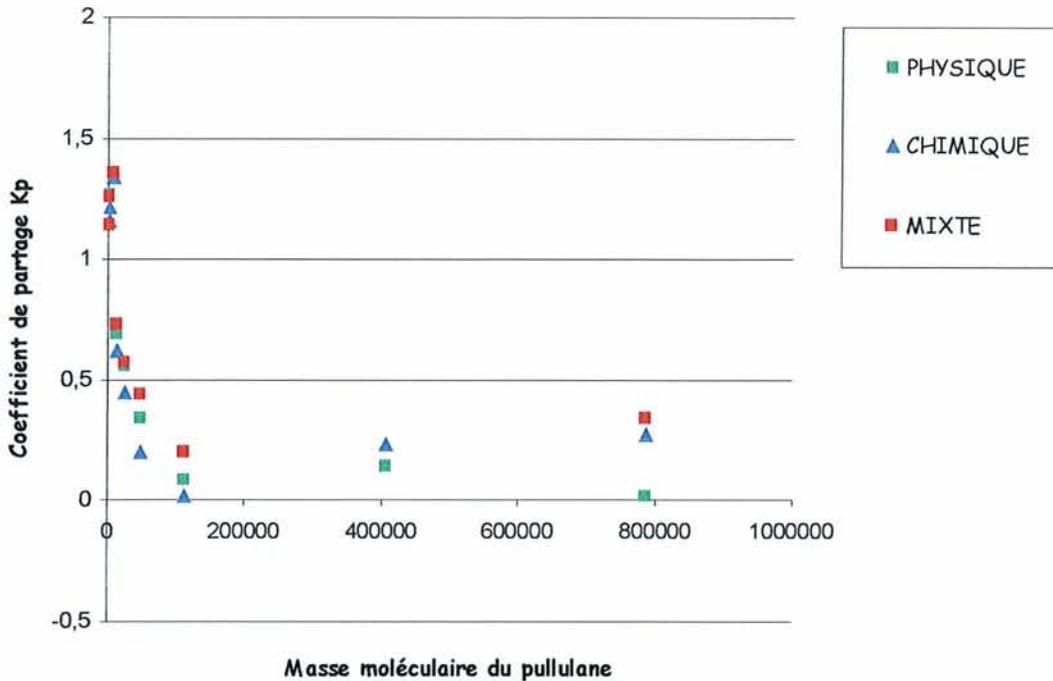


Figure 52 : Variation du coefficient de partage K_p en fonction de la masse molaire du pullulane (g/mol) dans les 3 types de gels.

Globalement, pour les plus petits pullulanes (jusqu'à $M=200\,000$ g/mol), le gel mixte semble présenter des valeurs de K_p plus importantes, ce qui s'expliquerait par la formation d'un réseau moins dense par rapport à des gels uniquement physiques ou chimiques.

Dans le cas de ces gels mixtes, on pourrait supposer dans un premier temps que les liaisons chimiques venant s'ajouter aux réticulations calciques densifient le réseau et limitent ainsi la possibilité d'entrée du polysaccharide dans les billes. Or, les résultats obtenus ne confirment pas cette hypothèse puisque les K_p des gels mixtes sont globalement supérieurs à ceux des gels physiques et chimiques.

En comparant gels chimiques et physiques, les K_p supérieurs pour les gels physiques amènent à penser que les gels chimiques possèdent des mailles plus rigides et/ou plus petites que les gels physiques.

Pour ce qui est des gels mixtes et chimiques, il est à noter que le réseau semble s'affaïsser quand on enlève le calcium, puisque les K_p ont tendance à diminuer.

On a également comparé les résultats obtenus dans un solvant différent : les valeurs de coefficients de partage des billes physiques dans le MES sont globalement du même ordre de grandeur que ceux obtenus dans $\text{NaCl}/\text{CaCl}_2$.

En outre, pour extrapoler ces résultats, il est également nécessaire de connaître les taux de gonflement des différents lots de billes dans le MES. Le gel mixte à 17 g/L présente le même taux de gonflement qu'un gel physique à 12 g/L : en comparant les deux séries de résultats, on note que les valeurs obtenues pour le gel mixte sont globalement inférieures à celles obtenues pour le gel physique. Ainsi, à taux de gonflement égal, le réseau semble moins dense pour le gel calcique.

Pour les gels chimiques, l'analyse élémentaire des échantillons lyophilisés a permis de montrer qu'après lavage par le citrate, le calcium n'est retrouvé qu'à l'état de traces (< 100 ppm) dans le gel.

2.3. DETERMINATION DU TAUX DE JONCTION AVEC L'AAD

2.3.1. Courbe d'étalonnage

Les résultats de mesure d'absorbance de la gamme d'étalonnage (décrite § 1.5.4. b.) sont regroupés dans le tableau suivant :

Tube gamme	G1	G2	G3	G4	G5
Quantité de TNBS initiale (μmol)	0,431	0,861	1,292	1,723	2,153
Absorbance à 327 nm	0,231	0,427	0,627	0,693	0,789

Tableau 11 : Gamme étalon pour le dosage du TNBS résiduel.

La méthode de dosage n'étant pas linéaire sur l'ensemble des points de la gamme, on décide de ne considérer que la partie linéaire du graphique dont l'équation est donnée.

On veillera donc à diluer de manière appropriée les tubes échantillon afin de se placer dans le domaine de linéarité de la méthode.

La droite d'étalonnage obtenue est représentée par la figure 53 ci-dessous :

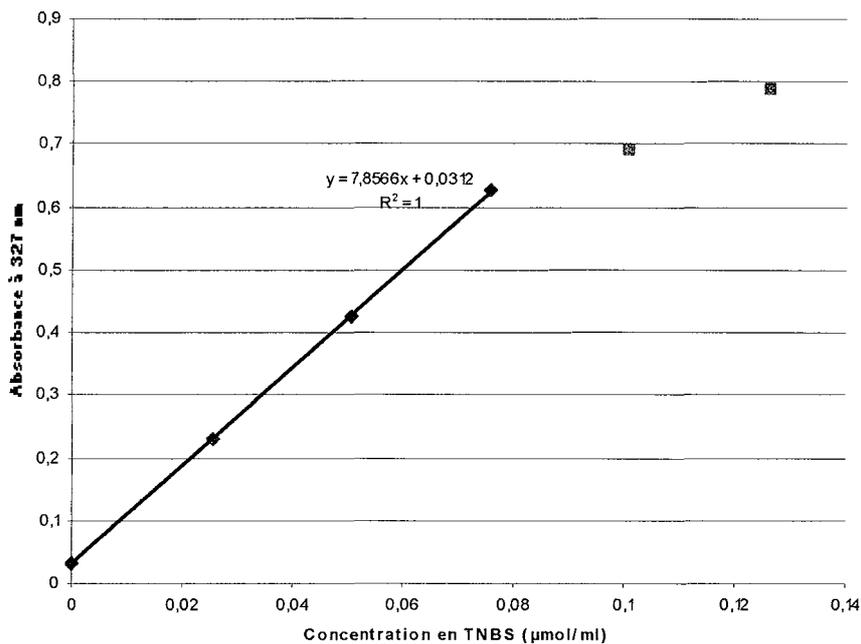


Figure 53 : Droite d'étalonnage du dosage du TNBS résiduel.

2.3.2. Résultats obtenus sur les lots de billes

Le dosage a été mis en œuvre sur 2 lots de billes utilisés pour les mesures de K_p :

- * Billes chimiques obtenues par lavage de billes mixtes dans une solution de citrate
- * Billes mixtes obtenues par réticulation calcique puis chimique

On suppose que la totalité de l'AAD libre a été éliminée par lavage (cf. § 1.5.3.).

L'analyse élémentaire nous permet d'accéder à la quantité de réticulant fixé par une ou deux extrémités au polymère ; le dosage permet d'accéder à la quantité d'AAD fixé par une extrémité.

Par différence, on accède au taux de jonction, c'est-à-dire aux molécules d'AAD fixées à l'alginate par leurs deux extrémités.

On définira alors le **taux de jonction** par la quantité d'AAD (fixée par ses deux extrémités) par gramme de billes.

Compte-tenu des délais analytiques importants imposés par le laboratoire réalisant l'analyse élémentaire des échantillons, nous ne disposons actuellement pas des résultats.

Ainsi, il n'est pas possible d'évaluer avec précision le taux de jonction.

On dispose seulement des données fournies par le dosage (AAD lié par une seule extrémité) :

Billes chimiques B5 : 0,493 μmol d'AAD lié par une extrémité/mg de polymère

Billes mixtes B6 : 0,632 μmol d'AAD lié par une extrémité/mg de polymère

Les ordres de grandeur sont les mêmes pour les deux échantillons ; on note toutefois une plus grande proportion de réticulant lié seulement par une extrémité dans les gels mixtes.

Les résultats de l'analyse élémentaire permettront de conclure par la suite sur l'efficacité de la réticulation dans les différents hydrogels.

Ces résultats ont été obtenus dans le cadre d'une première campagne d'essais de dosage sur billes lyophilisées ; toutefois, les valeurs obtenues nécessitent d'être confirmées par d'autres essais et une étude complémentaire de la robustesse de la méthode.

2.4. ETUDES RHEOLOGIQUES DES GELS MIS EN FORME

Pour réaliser les tests, on utilise un rhéomètre Dynamic Analyser RDA II muni d'un dispositif à plaques parallèles.

Une tranche de gel est positionnée dans la coupelle de mesure contenant le solvant du gel permettant d'hydrater l'échantillon. La rondelle est serrée entre les deux surfaces parallèles présentant de petits pics afin d'assurer le maintien de l'échantillon. Pour chaque échantillon, on relèvera la valeur de l'entrefer correspondante.

2.4.1. Tests de relaxation

Ce sont des gels mixtes qui ont été étudiés dans un premier temps : films G1 à G4 et boudins F3 à F7.

La différence essentielle entre ces deux groupes de gels réside dans le fait que les gels G1 à G4 ont été d'abord réticulés chimiquement puis physiquement, alors que les boudins F3 à F7 ont été d'abord réticulés par le calcium puis par l'AAD.

La figure suivante présente les résultats des tests de relaxation effectués sur ces deux groupes de gels.

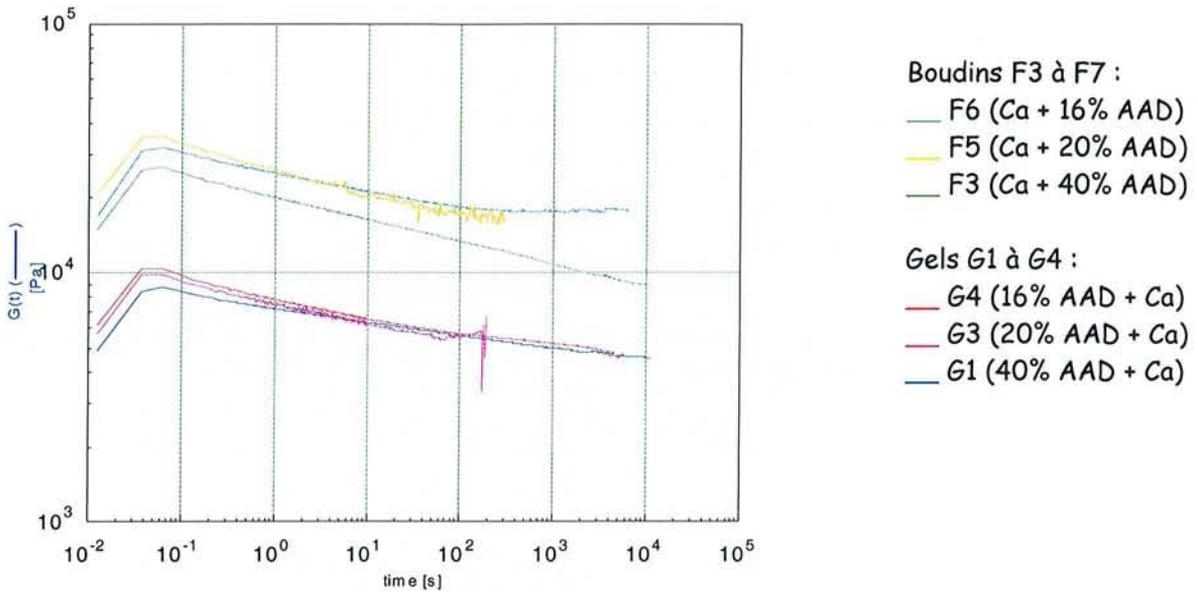


Figure 54 : Courbes de relaxation de gels mixtes.

Sur la figure précédente représentant $G(t)$ en fonction du temps, on peut se rendre compte qu'on n'obtient pas le même type de relaxation selon qu'on a procédé d'abord à la réticulation chimique ou physique. En effet, lorsqu'on procède d'abord à la réticulation chimique ($G1$ à $G4$), la réticulation calcique semble limitée.

On pourrait supposer que la fixation d'AAD sur les résidus guluronate diminue l'aptitude de la pelote de polymère à former des structures en boîte à œufs.

Il est également important de noter que les courbes de relaxation d'un gel mixte sont semblables à celles obtenues pour un gel uniquement physique ($F1$ et $F2$) ; la réticulation chimique d'un gel préalablement réticulé par le calcium ne modifie pas de façon sensible la relaxation du gel (même allure, même ordre de grandeur).

Cette information a orienté notre étude vers des tests en mode oscillatoire réalisés sur des films de gels réticulés uniquement chimiquement.

2.4.2. Tests en mode oscillatoire

Les films chimiques C2 à C7 ont été soumis à ce type de tests afin de rechercher une éventuelle relation entre le taux d'agent réticulant et la dureté du gel.

La figure suivante présente l'évolution de G' et G'' pour ces films chimiques à différents taux de réticulation :

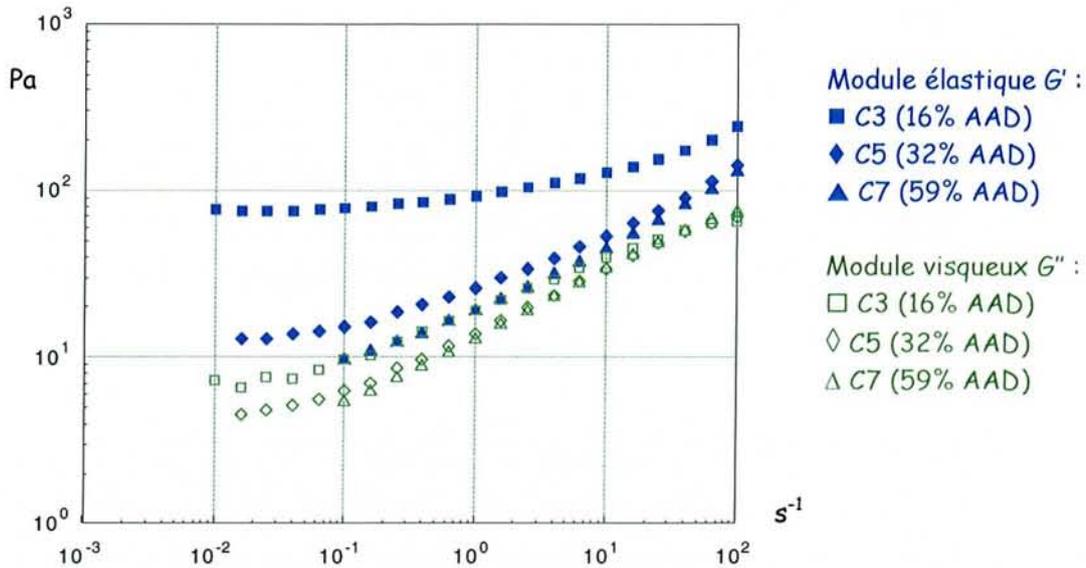


Figure 55 : Tests en mode oscillatoire.

D'après ces courbes obtenues en régime oscillatoire, on peut dire que la force du gel chimique diminue quand le taux d'agent réticulant augmente : en effet, on assiste à une diminution de G' quand le pourcentage d'AAD augmente.

On peut noter que l'écart existant entre le module élastique et le module visqueux diminue quand le taux d'agent réticulant augmente. L'écart entre G' et G'' étant plus important, l'angle de déphasage est plus faible ; or, plus cet angle est proche de 0, plus on se rapproche du cas hookéen.

Ainsi, cela confirme les conclusions faites en exploitant seulement les courbes de G' .

Finalement, après avoir mené cette étude expérimentale préliminaire, il reste encore de nombreux points d'ombre à explorer.

Dans un premier temps, les résultats de l'analyse élémentaire permettront de quantifier plus précisément le taux de jonction. Le "rendement de réticulation" étant alors connu, on pourra

CONCLUSION

Les alginates, nous l'avons vu, sont des polymères qui suscitent aujourd'hui beaucoup d'intérêt dans des domaines d'application variés. En pharmacotechnie, ils sont recherchés pour leurs propriétés épaississantes, liantes et désintégrantés; ils sont également utilisés pour des formulations retard et résistantes. L'industrie cosmétique en apprécie les propriétés filmogènes, adoucissantes, hydratantes et leur capacité à former des préparations qui s'étalent bien sur la peau et qui sont agréables au toucher.

Leurs propriétés sont également mises à profit dans l'industrie alimentaire toujours en quête de formulations originales et innovantes.

Au travers de cette thèse, nous avons pu brièvement dresser un inventaire des applications des alginates en tant qu'excipients dans la formulation des médicaments. En effet, l'utilisation de ceux-ci en tant que principes actifs n'a pas été abordée. A titre d'exemple, nous pouvons ici mentionner l'intérêt des alginates et de l'acide alginique en pathologie digestive. Ils sont en règle générale associés à de l'hydrogénocarbonate de sodium et à de l'hydroxyde d'aluminium et pris après le repas. L'acidité gastrique libère l'acide alginique qui forme un gel visqueux et mousseux (dégagement de dioxyde de carbone à partir de l'hydrogénocarbonate) réalisant une barrière flottante au-dessus du contenu gastrique. En cas de reflux, celui-ci est limité et le gel protège la muqueuse oesophagienne de l'agressivité du liquide gastrique.

Ces polysaccharides sont donc incorporés dans des préparations destinées au traitement symptomatique des troubles liés à l'acidité pathogène: reflux gastro-oesophagien, hernies hiatales, pyrosis, oesophagites.

Le projet expérimental faisant l'objet de la dernière partie de ce document consistait à étudier un gel d'alginate réticulé chimiquement par une diamine: l'acide adipique dihydrazine.

La méthode d'obtention de ce type de gel a été mise au point dans un premier temps ainsi que le dosage permettant d'accéder au taux de jonction.

Des études ont également porté sur les coefficients de partage du pullulane entre la phase gel et la phase surnageant. Cette approche expérimentale amènera très certainement, dans le cadre d'autres travaux de recherche, à étudier plus précisément les relations de cause à effet existant entre le taux de jonction et les phénomènes de partage, de diffusion, mais également la rhéologie des gels formés.

Finalement, on a pu voir que les alginates ouvrent d'importantes perspectives notamment dans le domaine de la microencapsulation, mais avant une utilisation de ceux-ci en thérapeutique, il s'avère nécessaire de connaître les phénomènes de diffusion sur lesquels s'appuie le relargage contrôlé des substances actives.

BIBLIOGRAPHIE

Ouvrages et publications

- [Algorithme, 2001] Algorithme n° 55 3^{ème} trimestre 2001 p 5
Dossier : Les alginates : hydrocolloïdes incontournables dans la fabrication des produits alimentaires restructurés
- [Algorithme, 2002] Algorithme n° 60 4^{ème} trimestre 2002 p 4
Dossier : alginates et bioencapsulation
- [Ansel et coll., 1999] Ansel H. C., Popovich N. G., Allen L. V.
Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems
7th Edition, 1999
- [Aynié et coll., 1997] Aynié I., Vauthier C., Fattal E., Foulquier M., Couvreur P.
Alginates nanoparticules as a novel carrier for antisense oligonucleotides
In Future strategies for drug delivery particulate systems
JE Diedrichs, RH Müller
CRC - Medpharm scientific publishers, 1997
- [Bazin, 1982] Bazin B.
Les algues ; utilisation des algues et de leurs dérivés dans l'industrie pharmaceutique et en thérapeutique
Thèse de Docteur en Pharmacie, Rennes, 1982
- [Bossard et coll., 2004] Bossard F., Sfika V., Tsitsilianis C.
Rheological properties of physical gel formed by triblock polyampholyte in salt-free aqueous solutions
Macromolecules, 2004, Manuscrit révisé en mars 2004, *In Press*
- [Bouffar-Roupe, 1989] Bouffar-Roupe C.
Chimie, structure et propriétés gélifiantes des alginates
Thèse de Doctorat, Université Joseph-Fourier, Grenoble I, 1989
- [Bouhadir et coll., 1999] Bouhadir K.H., Hausman D.S., Mooney D.J.
Synthesis of cross-linked poly(aldehyde guluronate) hydrogels
Polymer, 40, p. 3575-3584, 1999
- [Bowersock et coll., 1996] Bowersock et al.
Administration of ovalbumine encapsulated in alginate microspheres to mice
In Hydrogels and biodegradable polymers for bioapplications
Edited by R. M. Ottenbrite, S. J. Huang & K. Park
ACS Symposium Series 627, 1996
- [Bowersock, Hogenesch, 1997] Bowersock, Hogenesch
Oral immunization using microparticules
In Controlled Drug Delivery : challenges and strategies
Edited by Kinam Park
ACS professional ref book 1997
- [Bruneton, 1999] Bruneton J.
Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales
3^{ème} Edition
Editions Tec & Doc, 1999

- [Catesson, Robert, 2000] Catesson A-M., Robert D.
Organisation végétative
Biologie végétale volume 2
Doin Editeurs, 2000
- [Chapman, 1970] Chapman V. J.
Seaweeds and their uses
Second edition
Methuen & Co. LTD, 1970
- [Chèze-Lange et coll., 2002] Chèze-Lange H., Beunard D., Dhulster P., Guillochon D., Cazé A-M., Morcellet M., Saude N., Junter G-A
Production of microbial alginate in a membrane bioreactor
Enzyme and microbial Technology, 30, p. 656-661, 2002
- [Colwell et coll., 1984] Colwell R.R., Pariser E.R., Sinsky Anthony J.
Biotechnology of marine polysaccharides
Proceedings of the third anual MIT Sea Grant
College program lecture and seminar, 1984
- [Cousot, Grossiord, 2001] Cousot P., Grossiord J-L.
Comprendre la rhéologie - De la circulation du sang à la prise du béton
EDP Sciences, 2001
- [Couvreur, 1985] Couvreur P.
Vecteurs nanoparticulaires de médicaments
In Formes pharmaceutiques nouvelles : aspects technologique, biopharmaceutique et médical
Buri P., Puisieux F., Doelker E., Benoit JP
Technique et documentation Lavoisier, 1985
- [De Lestang-Bremond, Quillet, 1980] De Lestang-Bremond G., Quillet M.
Les polysaccharides de la paroi des algues brunes
In Biochimie appliquée - collection dirigée par Claude Costes
B. Monties
Les polymères végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés
Gauthier-Villars, 1980
- [Delaveau, 2003] Delaveau P.
Expliquez-moi les plantes
Pharmathèmes Edition - Communication Santé, 2003
- [Délépine et coll.] Délépine R., Gaillard J., Morand P.
Valorisation des algues et autres végétaux aquatiques (VALVA)
IFREMER - CNRS, 1988
- [Desprairies, 2002] Desprairies M.
Société Degussa - texturant systems
Les hydrocolloïdes autres que l'amidon
Septembre 2002
- [Dickinson, 1992] Dickinson E.
Les colloïdes alimentaires
Industries alimentaires - sciences de l'ingénieur
Masson, 1992

- [Dion, Lognoné, 2000] Dion P., Lognoné V.
La Production d'hydrocolloïdes à partir d'algues marines
Centre d'études et de valorisation des algues (CEVA)
Pour Polymerix 2000 - 7 et 8 juin 2000 à Rennes
- [Donadieu, Basise, 1985] Donadieu Y., Basise J.
Les thérapeutiques nouvelles - Les algues
Edition maloine, 1985
- [Draget et coll., 1997] Draget K.I., Skjak-Braek G., Smidsrod O.
Alginate based new materials
International Journal of Biological Macromolecules, 21, p. 47-55, 1997
- [Draget, 2000] Draget K.I.
Alginates
In Handbook of hydrocolloïds
Phillips G.O., Williams P.A.
CRC Press, 2000
- [Draget et coll., 2001] Draget K.I., Gaserod P., Aune I., Andersen P.O., Storbakken B., Stokke B.T., Smidsrod O.
Effects of molecular weight and elastic segment flexibility on syneresis in Ca-alginate gels
Food Hydrocolloïds, 15, p. 485-490, 2001
- [Edwards-Lévy et coll., 1993] Edwards-Lévy F., Andry M-C., Lévy M-C.
Determination of free amino group content of serum albumin microcapsules using trinitrobenzenesulfonic acid : effect of variations in polycondensation pH
International Journal of Pharmaceutics, 96, p. 85-90, 1993
- [Ertesvag, Valla, 1998] Ertesvag H., Valla S.
Biosynthesis and applications of alginates
Polymer Degradation and Stability, 59, p. 85-91, 1998
- [Favre, 2004] Favre E.
Génie de la formulation : Gels
Polycopié du cours de troisième année ENSIC Nancy, 2004
- [Finch, 1993] Finch C.A.
Industrial microencapsulation : polymers for microcapsule walls
In Encapsulation and controlled release
Edited by D.R. Karsa and R.A. Stephenson
London : The royal society of chemistry, 1993
- [Gayral, 1975] Gayral P.
Les algues : morphologie, cytologie, reproduction, écologie
Doin Editeurs, 1975
- [King, 1995] King A. H.
American Chemical Society series, 590, 1995
Encapsulation of food ingredients : a review of available technology, focusing on hydrocolloïds
- [Knetting et coll.] Knetting E., Volesky B., Zajic J.E
Properties and products of algae
Plenum Press
New York-London, 1970

Bibliographie

- [Koelwel et coll., 2002] Koelwel C., Lohmann C.P., Goepferich A.
Protein delivery to the eye : inserts for dry eyes syndrom therapy
In 4th Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology
Florence, 8-11 Avril 2002
- [Lapasin, Prid, 1995] Lapasin R., Prid S.
Rheology of industrial polysaccharides ; Theory and applications
Blackie Academic & Professional, 1995
- [Lee et coll., 2000] Lee K.Y., Rowley J.A., Eiselt P., Moy E.M., Bouhadir K.H., Mooney D.J.
Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by
cross-linker type and cross-linking density
Macromolecules, 33, p. 4291-4294, 2000
- [Lee et coll., 2004] Lee K.Y., Bouhadir K.H., Mooney D.J.
Controlled degradation of hydrogels using multi-functional cross-linking molecules
Biomaterials, 255, p. 2461-2466, 2004
- [Lévy, Poncelet, 1994] Lévy M.-C., Poncelet D.
Bio-encapsulation, les technologies
Biofutur, (132), Mars 1994, p. 16-21
- [Mancini et coll., 1999] Mancini M., Moresi M., Rancini R.
Mechanical properties of alginate gels : empirical characterisation
Journal of Food Engineering, 39, p. 369-378, 1999
- [Mautrait, Raoult, 1997] Mautrait C., Raoult R.
Les excipients exclusifs et partiels en pharmacie
2^{ème} Edition, 1997
- [Mazens, 2002] Mazens D.
Rapport de DEA - Conception de biomatériaux de comblement : hydrogels mixtes de
hyaluronate et d'alginate amphiphiles
Mémoire Diplôme d'Etudes Approfondies
Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, 2002
- [Mc Carthy, 1993] Mc Carthy S.
Biodegradable polymers for packaging
In Biotechnological polymers : medical, pharmaceutical and industrial applications
Edited by C. G. Gebelein, 1993
- [Mc Dowell, Percival, 1967] Mc Dowell R.H., Percival E.
Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides
Academic Press
London and New York, 1967
- [Michanek, 1984] Michanek G. , Département de biologie marine - Université de Göteborg - Suède
Seaweed ressources for cosmetology and phytotherapy
In Plantes et algues en cosmétologie et en phytothérapie : Nantes, 1984
Journées européennes de cosmétologie, 9, p. 261-271
- [Michoud, 2001] Michoud L.
Synthèse de la communication réalisée par Laurent Michoud de ISP Alginates lors de
polymerix 2000
Algorithme n° 55 3^{ème} trimestre 2001 p 4 et 5

Bibliographie

- [Morris et coll., 1980] Morris E.R., Rees D.A., Them D.
Characterisation of alginate composition and block-structure by circular dichroism
Carbohydrate Research, 81, p. 305-314, 1980
- [Offret, 1983] Offret C.
Les algues : alimentation et thérapeutique
Thèse de Docteur en Pharmacie, Rennes, 1983
- [Onsoyen, 1995] Onsoyen E.
Hydratation induced swelling of alginate based matrix tablets at GI-tract pH conditions
In Excipients and delivery systems for pharmaceutical formulations
Edited by DR Karsa & RA Stephenson
The Royal Society of Chemistry, 1995
- [Orecchioni] Orecchioni A-M.
Actifs marins, chapitre 11
- [Oulhen, 1986] Oulhen M.
Les algues en cosmetologie
Thèse de Docteur en Pharmacie, Rennes, 1986
- [Pérez, 1992] Perez R.
La culture des algues marines dans le monde
Ifremer 1992 p 16 à 60
chapitre I : Acide alginique et alginates
- [Pérez, 1997] Pérez R.
Ces algues qui nous entourent : conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture
Editions IFREMER, 1997
- [Pharm. Eur., 2002] Pharmacopée Européenne
Quatrième Edition, p. 652
Strasbourg : Conseil de l'Europe, 2002
- [Rastello, 2002] Rastello de Boissesson M.
Microparticules d'alginate associatifs : élaboration, caractérisation et encapsulation de molécules actives
Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine, 2002
- [Razzouk, 1998] Razzouk Y.
Les polymères gélifiants : utilisation de formes à application cutanée
Thèse de Docteur en Pharmacie, Marseille, 1998
- [Robin, 1996] Robin I.
Exploitation des alginates et des carraghénanes en industrie agro-alimentaire
Mémoire de Maîtrise des Sciences et Techniques de Nutrition et Diététique
Université Henri Poincaré, Nancy, 1996
- [Saude, Junter, 2002] Saude N., Junter G-A.
Production and molecular weight characteristics of alginate from free immobilized-cell cultures of *Azobacter vinelandii*
Process Biochemistry, 37, p. 895-900, 2002

Bibliographie

- [Schmitt, 1986] Schmitt L.
A propos de l'utilisation des algues en thérapeutique actuelle : perspectives d'avenir
Thèse de Docteur en Pharmacie, Nancy, 1986
- [Skaugrud, 1995] Skaugrud O.
Drug delivery systems with alginate and chitosan
In Excipients and delivery systems for pharmaceutical formulations
Edited by DR Karsa & RA Stephenson
The Royal Society of Chemistry, 1995
- [Sun, 1993] Sun A.M.
Encapsulation of living cells : potential medical applications
In 9th International Symposium on Microencapsulation
EDS Edition, 1993
- [Tanaka, 1981] Tanaka T.
Les gels
Pour la science, n°41, mars 1981 ; p. 62-78
- [Thu et coll., 1996] Thu B., Bruheim P., Espevik T., Smidsrod O., Soon-Shiong P., Skjak-Braek G.
Alginate polycation microcapsules : I. Interaction between alginate and polycation
Biomaterials, 17, 1996, p . 1031-1040
- [Whateley, 1996] T. L. Whateley
Microcapsules : preparation by interfacial polymerization and interfacial complexation
and their applications
In Drugs and the pharmaceutical sciences, vol 73 ; Microencapsulation methods and
industrial applications
Marcel Dekker Inc., 1996

Sites web consultés :

- [a] <http://www.seaweed.ucg.ie> (01/2004)
- [b] <http://www.fmcbiopolymer.com> (01/2004)
- [c] <http://www.ispcorp.com> (03/2004)
- [d] <http://www.biam2.org> (03/2004)
- [e] <http://pedagogie.ac-toulouse.fr/svt/labo/tampon.html> (05/2004)

TABLE DES FIGURES

FIGURES :

Figure 1	Formule chimique du mannose	6
Figure 2	Formules chimiques des monomères de l'acide alginique	6
Figure 3	Formation des liaisons oxygène entre les différents monomères avec départ d'une molécule d'eau	7
Figure 4	Agencement des monomères au sein du polymère d'acide alginique	8
Figure 5	Agencement en hélice du polymère d'acide alginique	10
Figure 6	Macrocystis pyrifera a : Photographie de Macrocystis pyrifera b : Schéma d'un jeune thalle de Macrocystis pyrifera	16
Figure 7	Laminaria hyperborea a : Photographie de Laminaria hyperborea b : Schéma de Laminaria hyperborea	17
Figure 8	Laminaria digita a : Photo de Laminaria digita b : Schéma de Laminaria digita	18
Figure 9	Laminaria saccharina a : Photographie de Laminaria saccharina b : Schéma de Laminaria saccharina	19
Figure 10	Photographie de Ascophyllum nodosum	20
Figure 11	Photographie de Fucus serratus	21
Figure 12	Fucus vesiculosus a : Photographie de Fucus vesiculosus b : Schéma de Fucus vesiculosus	21
Figure 13	Coupe schématique du système littoral	22
Figure 14	Parenté botanique des principaux alginophytes	23
Figure 15	Cartographie présentant la localisation des alginophytes	24
Figure 16	Structure schématique d'une cellule de Phéophycées	25
Figure 17	Modèle proposé pour l'organisation de la paroi chez les algues brunes	25
Figure 18	Variation saisonnière de la teneur en acide alginique chez Laminaria digita	27
Figure 19	Collecte de <i>Laminaria digita</i> sur la côte bretonne	30
Figure 20	Diagramme-bloc des procédés d'extraction de l'acide alginique	33
Figure 21	Système rotatif permettant de filtrer l'alginate de sodium	37
Figure 22	Organisation d'une usine d'extraction : méthode directe par précipitation acide	42
Figure 23	Commerce mondial en tonnes de phycocolloïdes en 1980	46
Figure 24	Commerce mondial en millions de dollars en 1980	47
Figure 25	Production mondiale d'algues à colloïdes en 1995 : place des alginophytes.	48
Figure 26	Production mondiale d'algues à colloïdes en 1995 : place des alginophytes	48
Figure 27	Part des différents alginophytes dans la production mondiale	49

Figure 28	La transition sol-gel	52
Figure 29	Formation de ponts avec le calcium	54
Figure 30	Mise en place de la structure "boite à œufs" en présence de calcium	54
Figure 31	Rôle des zones à acide guluronique dans la structure en "boite à œufs"	55
Figure 32	Illustration de l'effet de la concentration c du polymère sur la structure d'une solution macromoléculaire	56
Figure 33	Variations de la viscosité selon le type d'alginate en solution et en fonction de la concentration de l'agent gélifiant	64
Figure 34	Influence de la température sur la viscosité des solutions d'alginate	66
Figure 35	Influence du pH sur la viscosité des solutions obtenues	67
Figure 36	Paramètres influençant la viscosité des solutions d'alginate	70
Figure 37	Mécanisme de libération prolongée d'un comprimé intragastrique flottant (a) et d'un comprimé bicouche flottant (b)	76
Figure 38	Cinétique de libération de chlorphéniramine à partir de systèmes gélifiés renfermant différents pourcentages d'alginate de sodium	77
Figure 39	Production de TNF (Tumour Necrosis Factor) en réponse à des alginate contenant différentes proportions d'acides mannuroniques	90
Figure 40	Spectre de dichroïsme circulaire de l'alginate de sodium utilisé pour notre étude	96
Figure 41	Courbes de corrélation entre le rapport M/G des dérivés mannuronate et guluronate d'un échantillon d'alginate de sodium et le rapport des intensités p/t	96
Figure 42	Billes d'alginate de calcium a : Montage utilisé pour la mise en forme b : Photographie de billes	100
Figure 43	Structure chimique de la molécule d'EDC	102
Figure 44	Structure chimique de la molécule de N-hydroxysuccinimide	103
Figure 45	Structure chimique de la molécule d'acide adipique dihydrazine	103
Figure 46	Schéma du mécanisme réactionnel mis en jeu lors de la réticulation chimique par l'AAD	104
Figure 47	Structure chimique d'un alginate poly-G réticulé par l'AAD	105
Figure 48	Définitions : contrainte et déformation	106
Figure 49	Représentation schématique de G' , G'' et δ	108
Figure 50	Mise au point de la méthode de lavage des billes.	111
Figure 51	Dosage du pullulane par l'antrone	114
Figure 52	Variation du coefficient de partage K_p en fonction de la masse molaire du pullulane (g/mol) dans les 3 types de gels	119
Figure 53	Droite d'étalonnage du dosage du TNBS résiduel	121
Figure 54	Courbes de relaxation de gels mixtes	123
Figure 55	Tests en mode oscillatoire	124

TABLEAUX :

Tableau 1	Diversité de composition des alginates	11
Tableau 2	Proportion d'acide mannuronique (%) dans les alginates extraits des différentes parties de thalles	12
Tableau 3	Classification succincte des différents phylums regroupant les algues	13
Tableau 4	Teneurs en acide alginique de divers alginophytes	26
Tableau 5	Préparation de la gamme étalon permettant la quantification du TNBS	112
Tableau 6	Présentation des films réalisés	115
Tableau 7	Présentation des boudins réalisés	116
Tableau 8	Présentation des billes réalisées	116
Tableau 9	Récapitulatif des fractions massiques en polymère dans les différents gels	117
Tableau 10	Variation du coefficient de partage K_p en fonction de la masse molaire du pullulane (g/mol) dans les 3 types de gels.	118
Tableau 11	Gamme étalon pour le dosage du TNBS résiduel	120

ANNEXES

ANNEXE I

Analyse d'algues Laminaria Digita
Ref. ALGOVERT "N" Lot 840101

[Oulhen, 1986]

Analyse physique :

Aspect physique : poudre impalpable de couleur vert clair

Odeur caractéristique d'algues laminaires fraîches

Densité apparente : 0,51

Densité après tassement : 0,76

pH en solution à 10 % : 6,66

granulométrie : 100 % de passage à 80 µm

Viscosité d'une solution à 10% de farine, gonflement 3 heures (Brookfield RVT, 20°C) : 3000 cps

Volume d'un gramme de farine d'algues après 3 heures de gonflement dans l'eau à 20°C : 16 cm³

Analyse chimique :

Humidité : 2,70 %

Matière sèche : 97,30 %

Matière minérale : 31,10 %

Matière organique : 66,20 %

Matières organiques exprimées en % sur matière sèche :

Acide alginique : 26%

Matière cellulosique : 5,7 %

Protéines brutes : 5,56 %

Matière grasse et substances solubles dans l'éther : 0,40%

Mannitol : 8,1%

Matières minérales exprimées en % sur matière sèche :

Calcium : 1,12 %

Potassium : 14,9 %

Azote : 0,89 %

Soufre : 0,92 %

Sodium : 3,65 %

Magnésium : 0,62 %

Phosphore : 0,24 %

Iode : 0,53 %

Fer : 0,06 %

Oligo-éléments en ppm :

Manganèse : 16,2 ppm

Zinc : 31,0 ppm

Cuivre : 1,4 ppm

Molybdène : 2,7 ppm

Plomb : 0,8 ppm

Vanadium : <1 ppm

Etain : < 3 ppm

Cobalt : < 0,5 ppm

Nickel : 0,65 ppm

ANNEXE II

Extrait de la Pharmacopée Européenne

01/2002 :0591

ALGINIQUE (ACIDE)

Acidum alginicum

[Pharm. Eur., 2002]

DEFINITION

L'acide alginique est un mélange d'acides polyuroniques $[(C_6H_8O_6)_n]$ constitués par des résidus de l'acide D-mannuronique et de l'acide L-guluronique. Il est obtenu principalement à partir d'algues appartenant à la famille des Phéophycées. Une petite proportion des groupes carboxyle de l'acide alginique peut être salifiée. L'acide alginique contient au minimum 19 pour cent et au maximum 25 pour cent de groupes carboxyle (COOH), la teneur étant calculée par rapport à la substance desséchée.

CARACTERES

Poudre cristalline ou amorphe, blanche ou brun-jaune pâle, très peu soluble ou pratiquement insoluble dans l'alcool et les solvants organiques. L'acide alginique gonfle dans l'eau mais ne s'y dissout pas ; il se dissout dans les solutions d'hydroxydes alcalins.

IDENTIFICATION

- A. A 0,2g d'acide alginique, ajoutez 20 ml d'eau R et 0,5 ml de solution de carbonate de sodium R. Agitez et filtrez. A 5 ml du filtrat, ajoutez 1 ml de solution de chlorure de calcium R. Il se forme une volumineuse masse gélatineuse.
- B. A 5 ml du filtrat obtenu dans l'identification A, ajoutez 0,5 ml d'une solution de sulfate de magnésium R à 123 g/l. Il ne se forme pas de volumineuse masse gélatineuse.
- C. A 5 mg d'acide alginique, ajoutez 5 ml d'eau R et 5 ml d'une solution récemment préparée de 1,3-dihydroxynaphtalène R à 10 g/l dans l'alcool R et 5 ml d'acide chlorhydrique R. Faites bouillir doucement pendant 3 minutes, refroidissez, ajoutez 5 ml d'eau R et agitez avec 15 ml d'éther isopropylique R. Effectuez un essai à blanc. La couche supérieure du mélange obtenu avec la substance à examiner présente une coloration rouge-bleue plus intense que celle obtenue avec l'essai à blanc.

ESSAI

Chlorures. A 2,50 g d'acide alginique, ajoutez 50 ml d'acide nitrique dilué R. Agitez pendant 1 heure, puis complétez à 100 ml avec de l'acide nitrique dilué R. Filtrez. A 50 ml du filtrat, ajoutez 10 ml de nitrate d'argent 0,1M et 5 ml de toluène R. Titrez par le thiocyanate d'ammonium 0,1M en présence de 2 ml de solution de sulfate ferrique et d'ammonium R2 en agitant énergiquement à l'approche du virage.

1 ml de nitrate d'argent 0,1M correspond à 3,545 mg de Cl. L'acide alginique ne contient pas plus de 1 pour cent de chlorures.

Métaux lourds. 1 g d'acide alginique satisfait à l'essai limite F des métaux lourds (20 ppm). Préparez le témoin avec 2 ml de solution à 10 ppm de plomb (Pb) R.

Perte à la dessiccation. Déterminée à l'étuve à 100-105°C sur 0,1 g d'acide alginique pendant 4 heures, la perte à la dessiccation n'est pas supérieure à 15 pour cent.

Cendres sulfuriques. Déterminé sur 0,1 g d'acide alginique et calculé par rapport à la substance desséchée, le taux de cendres sulfuriques n'est pas supérieur à 8 pour cent.

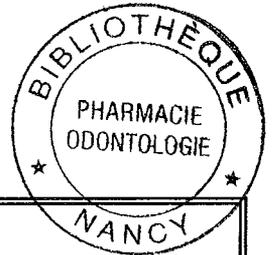
Contamination microbienne. L'acide alginique satisfait à une limite du nombre de germes aérobies viables totaux de 102 microorganismes par gramme, déterminé par dénombrement sur plaque de gélose. L'acide alginique satisfait aux essais d'*Escherichia coli* et des salmonelles.

DOSAGE

A 0,25g d'acide alginique, ajoutez 25 ml d'eau R, 25 ml d'hydroxyde de sodium 0,1M et 0,2ml de solution de phénolphaléine R. Titrez par l'acide chlorhydrique 0,1M. 1 ml d'hydroxyde de sodium 0,1M correspond à 4,502 mg de groupes carboxyle (COOH).



DEMANDE D'IMPRIMATUR



DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présenté par Isabelle GOUJON

Sujet :

LES ALGINATES : EXCIPIENTS D'ORIGINE MARINE UTILISES DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE Application à la synthèse d'un gel chimique

Jury :

Président: M. Philippe MAINCENT, Professeur

Juges : M. Eric FAVRE, Professeur M. Aif LAMPRECHT, Maître de conférences

Vu,

Nancy, le 24 Mai 2004

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse

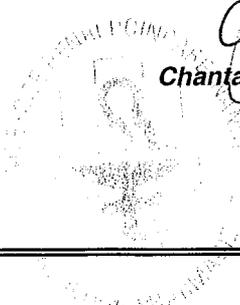
M. Philippe MAINCENT, M. Eric FAVRE Professeur Professeur

Vu et approuvé,

Nancy, le 25 mai 2004

Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Chantal FINANCE

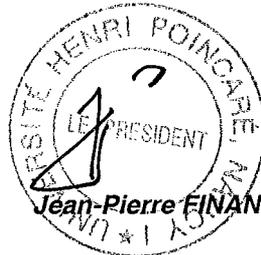


N°1966

Vu,

Nancy, le 1er juin 2004

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,



N° d'identification : PHNancy04 n°40

**LES ALGINATES : EXCIPIENTS D'ORIGINE MARINE UTILISES
DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE
Application à la réticulation chimique d'un gel**

Thèse soutenue le 21 juin 2004

Par Isabelle GOUJON

RESUME :

Les substances synthétisées par les algues sont très sensiblement différentes de celles fabriquées par les végétaux, tant au niveau des métabolites primaires, comme les polyholosides, qu'au niveau des métabolites secondaires. Les extraits de végétaux marins sont omniprésents dans notre vie quotidienne. Ils permettent en effet, entre autres emplois, de donner à la plupart des solutions aqueuses que nous utilisons couramment, la texture souhaitée et sont désignés sous le nom de phycocolloïdes ou sous l'appellation plus générale de "structurants".

Parmi ces colloïdes, on retrouve les alginates qui feront l'objet de ce document. Cette famille de polymères est ici étudiée aussi bien sous l'angle botanique que sous celui des procédés industriels liés à leur extraction.

Dans le domaine de la formulation galénique, les alginates sont très largement utilisés ; nous détaillons ici quelques applications telles que la libération contrôlée dans les formes sèches, la mise en forme de médicaments à usage topique, mais également la microencapsulation de cellules et principes actifs. Un volet expérimental consistant à étudier un gel d'alginate réticulé chimiquement par une diamine (l'acide adipique dihydrazine) est ici brièvement exposé ainsi que l'étude des phénomènes de partage d'un polysaccharide (pullulane) entre le surnageant et des billes de gel.

Les perspectives d'avenir des alginates en terme d'applications médicales semblent prometteuses, et de nombreuses études à ce sujet sont aujourd'hui en cours.

MOTS CLES :

Alginate / Algue / Excipient / Industrie
Gel / Réticulation

Directeurs de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Monsieur le Pr Philippe MAINCENT	Laboratoire de Pharmacie Galénique	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
Monsieur le Pr Eric FAVRE	Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (ENSIC Nancy)	Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/>
		Thème <input checked="" type="checkbox"/>

Thèmes :

- 1 - Sciences fondamentales
- 2 - Hygiène / Environnement
- 3 - Médicament
- 4 - Alimentation - Nutrition
- 5 - Biologie
- 6 - Pratique professionnelle