REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE FERHAT ABBAS-SETIF

FACULTE DES SCIENCES DE L'INGENIEUR

DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCEDES

MEMOIRE

Présenté par

EL KOLLI HAYET

En vue de l'obtention du diplôme de

MAGISTER

Option : Génie des procédés pharmaceutiques

Thème

Etude de la réticulation par le glutaraldéhyde de deux gélatines de nature et de Blooms différents et son effet sur certaines propriétés

Soutenu le : 07/03/2009

Devant le jury :

Président :	Dr. F. Djerboua	Maître de conférences	U.F.A.S. Sétif
Rapporteur :	Dr. M. El kolli Merbah	Maître de conférences	U.F.A.S. Sétif
Examinateurs :	Dr. F. Bouzarafa	Maître de conférences	U.F.A.S. Sétif
	Dr. A. Maiza	Maître de conférences	U.F.A.S. Sétif
Membre invité :	Melle S. Chaibi	Maître assistante	U.F.A.S. Sétif

ملخص:

تم تحضير رقائق جافة من مادتي الجيلاتين الحيوانية والنباتية مؤلفة أساسا من محلول مائي بتركيز 5%وعند درجة حرارة اقل من 40 ْم

-تمت عملية التجفيف في صحون بتري المصنوعة من متعدد الستيرين في الهواء.

-ثم حدثت عملية الترابط بواسطة الغليتار الدهيد المسكوب على سطح الرقائق مما أدى إلى تكوين نسيج مترابط بين المادتين اكسب الرقائق خواص ميكانيكية أفضل.

-عملية تشخيص ودراسة هذه الرقائق تمت عن طريق الاختبارات التالية:

- اختبارات الجذب الميكانيكي التي أثبتت تحسن في الخصائص الميكانيكية خاصة بالسبة لتركيزات 1.5% ,2.0 % ,2.5%من الغليتار الدهيد.

-بينت عملية الانتفاخ تأثير عامل الوقت على قدرة الامتصاص وكذلك التأثير الايجابي لإضافة الاملاّح مثلPBS المحلول الموقي للفوسفات

- ومن خلال طريقة المعايرة بواسطة حمض:6,4,2-ثلاثي البنزين السلفوني ثم تقدير عدد المجموعات الامينية ع-الموجودة داخل الجيلاتين التي وجد أنه تتناقص بزيادة تركيز الغليتار الدهيد كما تم بهذه الطريقة حساب درجة التشابك.

- من خلال تقنية تفاضل المسح الحراري الكالوري متري(C.S.D) تم تحديد درجة تحولها الزجاجي

والتي وجد أنها حساسة لكل من تركيز الغليتار الدهيد وطبيعة الجيلاتين،وكذلك مجال الاستقرار الحراري للرقائق

-أما فيما يخص التحليل بواسطة تقنية الكسار الأشعة السينية(X.R.D) فهو يثبت و يدعم النتائج المتحصل عليها سابقا من الاختبارات الأخرى

-وأخيرا ما يمكن استنتاجه هو أن رقائق الجيلاتين النباتية تتمتع بخصائص أفضل من الجيلاتين الحيوانية وذلك عند تطبيق نفس الشروط التجريبية.

Résumé

La préparation des films secs à base de gélatine soit animale ou végétale se fait par une hydrosolubilisation des grains à 5% en masse et à température inférieure à 40 °C.

Le séchage se fait à l'air libre sur des supports hydrophobes en polystyrène.

La réticulation se fait par le glutaraldéhyde avec différentes concentrations et conduit à l'obtention des films moins friables grâce à la formation d'un réseau réticulé plus serré.

La caractérisation est faite par les tests suivants :

Les tests mécaniques de traction montrent qu'il y a amélioration des propriétés mécaniques surtout pour les concentrations de 1.5, 2.0 et 2.5 % en glutaraldéhyde.

L'étude de gonflement révèle l'influence du temps sur la capacité d'absorption de ces films, ainsi que l'influence des sels de PBS sur ce paramètre.

La méthode de dosage utilisant le TNBS permet l'évaluation du nombre de moles des ε-amino groupes présents dans la gélatine qui diminuent en fonction de la concentration du glutaraldéhyde, comme elle permet de calculer le taux de réticulation.

L'analyse thermique (D.S.C.) permet la détermination de son Tg (température de transition vitreuse) qui est sensible à la nature de la gélatine et à la concentration de l'agent réticulant, et le domaine de stabilité thermique des films.

L'analyse par DRX confirme les résultats trouvés par les autres tests.

En fin, il faut noter que ces tests prouvent que les films préparés à base de gélatine végétale possèdent des propriétés meilleures que les films préparés à base de gélatine animale dans les mêmes conditions expérimentales.

Summary

Dry gelatine films either animal or vegetable were prepared from aqueous solution by hydrosolubilisation of 5 % of gelatine at a temperature lower than 40°C.

Films were obtained on polystyrene Petri dishes by drying at room temperature.

Chemical cross-linking was obtained by glutaraldehyde treatments at different concentrations.

The chemical reaction leads to films more flexible and less crumbly, because of the development of cross-linking network.

Characterisations were done by the following tests:

The mechanicals tests show that cross-linked films have better mechanical properties particularly with concentrations:

1.5 ; 2.0 and 2.5 % of glutaraldehyde.

The study of swelling reveals on the one hand, the effect of time on the absorption capacity and on the other hand the effect of addition of PBS salt on this parameter.

The method of mixture using TNBS solution enables the evaluation of the number ε-amino groups present inside the gelatine and also enables the account of the rate of cross-linking.

The D.S.C. analysis shows that gelatine is classed under semi-crystalline polymers.

This technique enables the determination of Tg (glassy transition temperature) and the domain of its thermal stability.

The XDR analysis proves the result obtained by the other tests.

Finally, it is found that films prepared by vegetable gelatine possess better properties than films obtained by animal gelatine at the same experimental conditions.

SOMMAIRE

Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux

INTRODUCTION GENERALE i

I. LES GELS POLYMERIQUES 01

I-1. Classification des gels polymériques ……. 02
I-1-1. Les gels physiques…….. 03
I-1-2. Les gels chimiques …… 03
I-2. Transition sol-gel…… 04
I-3. Propriétés des gels polymériques …….. 04
I-4. Réticulation des gels polymériques…… 06
I-4.1. Paramètres contrôlant la réticulation……...…… 06
I-4-2. Principales réactions de réticulation……... 06

II. LA GELATINE ET SES APPLICATIONS BIOMEDICALES 08

II-1. Composition chimique de la gélatine ……... 09
II-2. Transformation du collagène en gélatine ……...…….. 11
II-3. Structure moléculaire de la gélatine …..……... 12
II-4. Configuration de la molécule de gélatine…….. 13
II-5. Gel de gélatine……... 14
II-5-1. Effet de la température sur les gels de gélatine……... 15
II-6. Propriétés physico-chimiques de la gélatine…… 15
II-6-1. Point isoélectrique……... 16
II-6-2. Solubilité et gonflement……..... 17
II-6-3. Viscosité……..... 18
II-6-4. Pouvoir gélifiant ou force de gel…… 20
II-6-4-1.Signification du degré de bloom……... 20
II-6-4-2.Mécanisme de gélification…… 21
II-6-4-3.Conditions d'une gélification complète…… 22
II-7. Critères de choix de la gélatine en chimie pharmaceutique…….. 23
II-7-1. Pouvoir épaississant…….. 23
II-7-2. Pouvoir filmogène……. 23
II-7-3. Pouvoir émulsifiant……... 23
II-7-4. Pouvoir foisonnant……... 23
II-7-5. Pouvoir stabilisant……. 24
II-7-6. Pouvoir moussant…….. 24
II-8. Applications pharmaceutiques…….. 24

II-9. Exemples des applications…… 24

II-9-1. Les capsules de gélatine…… 24
II-9-2. Les substituants du plasma……... 25
II-9-3. L'encapsulation des vitamines…….. 25
II-9-4. L'immobilisation…….. **26**
II-10. Réticulation chimique de la gélatine……... **27**
II-11. Principaux agents de la réticulation chimique de la gélatine…….. **29**

III. PARTIE EXPERIMENTALE 32

III-1. Matériels et méthodes…….. 33
III-1-1. Matériels…… 33
III-1-2. Méthodes……... 33
III-1-2-1. Préparation de films secs de gélatine…….. 33
III-1-2-2. Réticulation des films de gélatine par le glutaraldéhyde. 34
III-2. Caractérisation des films…….. 34
III-2-1. Essais mécaniques de traction…… 34
III-2-2. Essai de gonflement……..…… 35
III-2-3.Détermination du nombre de moles des ε-amino groupes et évaluation du taux de réticulation par le TNBS…….. 37
III-2-4. Analyse thermique à balayage différentiel (D.S.C.)……... 38
III-2-5. Analyse par diffraction des rayons X……. 40

IV.RESULTATS ET DISCUSSIONS 41

IV-1. Films secs avant réticulation…… 41
IV-2. Films de gélatine réticulée par le glutaraldéhyde…… 42
IV-3.Tests mécaniques de traction…… 46
IV-4.Gonflement……... 48
IV-4-1. Taux de gonflement…….. 48
IV-5. Détermination du nombre de moles des ε-amino groupes et évaluation du taux de réticulation par le TNBS……. 52
IV-6.Analyse thermique enthalpique (D.S.C.).....…… 56
IV-7.Résultats des rayons X…….. 58

CONCLUSION 60

REFERENCES 63

Annexe 1 Graphes des tests mécaniques de tractions……... 67
Annexe 2 Courbes de gonflement……. 75
Annexe 3 Spectres UV Vis du test de TNBS……... 82
Annexe 4 Thermogrammes de D.S.C.……... 84
Annexe 5 Diffractogrammes des rayons X……... 89

LISTE DES ABREVIATIONS

Gel A : Gélatine animale de bloom 225 et de type B

Gel V : Gélatine végétale de bloom 300 et de type B

GA : Glutaraldéhyde

PBS : Solution tampon de phosphate, pH = 7,4

G (%) : Gonflement

Gmax (%) : Gonflement à l'équilibre

Tg : Température de transition vitreuse

Tg (Gel V): Température de transition vitreuse de la gélatine végétale

Tg (Gel A): Température de transition vitreuse de la gélatine animale

Tm : Température de la transition de la structure hélicoïdale en la triple hélice

TNBS : L'acide 2, 4, 6-trinitrobenzène sulfonique

$\mathbf{N_1}$: Nombre de moles des ε-amino groupes qui a réagi avec le TNBS

$\mathbf{N_2}$: Nombre de moles des ε-amino groupes qui n'a pas réagi avec le TNBS

MPa : Méga Pascal

PS : Polystyrène

Xc : Taux de cristallinité

pI : Point isoélectrique

σ_r : contrainte à la rupture

ε_r : déformation à la rupture

Wr: énergie de rupture

E : module d'élasticité (module de Young)

LISTE DES FIGURES

FigureI.1: schéma représentant le modèle de gélification par zones de jonction : gel physique (p. 03)

Figure I.2: schéma représentant le modèle de gélification par jonctions ponctuelles : gel chimique (p. 04)

Figure I.3: schéma représentant les différentes applications biomédicales des gels (p. 05)

FigureII.1: images montrant la structure fibreuse du collagène 63 constituant de base de la gélatine (p. 09)

Figure II.2: schéma représentant les étapes de formation de la triple hélice de la gélatine (p. 12)

FigureII.3: Représentation chimique de la structure typique de la gélatine (p. 13)

FigureII.4: image montrant la microscopie électronique d'un gel de gélatine à l'équilibre (p.14)

Figure II.5: image montrant l'influence du pH sur la distribution du poids moléculaire de la gélatine (p. 15)

Figure II.6: image montrant l'influence de la température sur la distribution du poids moléculaire de la gélatine (p. 16)

Figure II.7: schéma montrant l'effet du pH sur la distribution des charges électriques pour les types A et B de gélatine (p. 17)

Figure II.8: courbes montrant la variation du gonflement en fonction du temps et en fonction de la taille des particules de la gélatine (p. 17)
Figure II.9: graphes montrant l'effet du pH sur la variation de la viscosité pour la gélatine pure et pour la gélatine additionnée au sel (p. 18)
Figure II.10: courbe montrant l'influence de la température sur la viscosité (p. 19)
Figure II.11: courbes montrant l'influence de la concentration sur la viscosité (p. 19)
Figure II.12: schéma représentant le phénomène de gélification de la gélatine (p. 22)
Figure II.13: schéma représentant le modèle de l'encapsulation des principes actifs par la gélatine (p. 26)
Figure II.14: schéma représentant la fixation d'antibiotiques sur les liposomes par l'intermédiaire d'une molécule de gélatine (p. 26)

Figure II.15: schéma représentant la technique d'immobilisation d'antigènes et d'anticorps sur un support de gélatine -Réponse immunologique (p. 27)
FigureII.16: schéma représentant les différents types des liaisons formées entre les chaînes peptidiques de la gélatine par réticulation chimique (p. 28)
Figure III.1: le graphe typique contrainte-déformation d'un polymère amorphe (p. 35)
Figure III.2: réaction de l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique avec les groupements amino-protéines en milieu alcalin (p. 37)
Figure III.3: le thermogramme typique (D.S.C.) de la gélatine (p. 39)
Figure IV.1: photo des films de gélatine réticulée par le glutaraldéhyde, 3% en GA (p. 43)
Figure IV.2: réaction de réticulation de la gélatine par le glutaraldéhyde (p. 44)
Figure IV.3: schéma représentant la réticulation intermoléculaire entre les chaînes de gélatine et les molécules de glutaraldéhyde (p. 45)
Figure IV.4: courbes montrant les valeurs de la déformation en fonction de la concentration pour les deux types de gélatine (p. 46)
Figure IV.5: courbes montrant les valeurs de la contrainte à la rupture en fonction de [GA] pour les deux types de gélatine (p. 47)
Figure IV.6: courbes montrant les valeurs de module de Young en fonction de [GA] pour les deux types de gélatine (p. 48)
Figure IV.7: courbes montrant les valeurs de Gmax pour la Gel A en fonction de [GA] (p. 50)

Figure IV.8: courbes montrant les valeurs de Gmax pour la Gel V en fonction de [GA] (p. 51)

Figure IV.9: comparaison entre les courbes de Gmax dans (eau/PBS) pour les deux types de gélatine (p. 51)
Figure IV.10: courbes représentant la variation du degré de réticulation en fonction de [GA] pour les deux types de gélatine (p. 53)
Figure IV.11: courbes représentant la variation du nombre de moles de ε-amino groupes qui ont réagi avec le TNBS (N_1) en fonction de [GA] (p. 54)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1: tableau représentant les différents types des gels selon la nature des solvants (p. 02)

Tableau I.2: tableau représentant les différentes méthodes de réticulation des gels polymériques (p. 07)

Tableau II.1: tableau représentant le nombre d'acides aminés (× 1000 résidus) présents dans les deux types de gélatine et dans le collagène (p.10)

Tableau II.2: tableau représentant les conditions de normalisation selon British Sandard (p. 21)

Tableau IV.1: tableau représentant le nombre de moles des ε-amino groupes et les degrés de réticulation des différents films de Gel A en fonction de [GA] (p. 52)

Tableau IV.2: tableau représentant le nombre de moles des ε-amino groupes et les degrés de réticulation des différents films de Gel V en fonction de [GA] (p.53)

Tableau IV.3: tableau représentant les valeurs de Tg pour les différents films de gélatine réticulée par le glutaraldéhyde (p. 58)

Tableau IV.4: tableau montrant les taux de cristallinité des films de Gel A calculés à partir des difractogrammes de DRX (p. 59)

Tableau IV.5: tableau montrant les taux de cristallinité des films de Gel V calculés à partir des difractogrammes de DRX (p. 59)

INTRODUCTION GENERALE

Les biomatériaux à base d'une matrice de gélatine ont été développés pour préserver l'intégrité et le confort de la vie des personnes victimes de blessures ou de brûlures. L'objectif de leur développement est de permettre la fabrication de dispositifs d'assistance corporelle capables de suppléer les fonctions des organes lésés. Ces biomatériaux recouvrent une grande variété d'applications biomédicales puisqu'ils peuvent être à la fois des matériaux de réparation des lésions tissulaires et être constitutifs de systèmes d'assistance extra corporelle.

Notre équipe de recherche s'intéresse à cette matrice de gélatine qui possède d'excellentes propriétés thérapeutiques surtout en microchirurgie, mais les problèmes de son instabilité à la température du corps humain, et ses faibles propriétés mécaniques restent jusqu'à ce jour posés.

Pour palier à ces insuffisances, différents films à base de gélatine ont été conçus et modifiés par différents agents à savoir : le glutaraldéhyde, le formaldéhyde, le propionaldehyde, l'acétaldéhyde, l'hexaméthylène diisocyanate…etc. comme inducteurs de réticulation ; la résorcine, le glycérol, la carboxymethyl cellulose sodique, l'alcool polyvinylique …etc. comme plastifiants et/ou modifiants **[1-3].**

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la préparation de films de gélatine de deux natures différentes et réticulés en utilisant des concentrations croissantes de glutaraldéhyde en l'absence de modifiants et d'additifs.

A ce propos, quelques notions sur les gels polymériques ont été développées. Ensuite, un aperçu sur l'intérêt de la gélatine dans le domaine biomédical a été donné.

Au niveau de la partie expérimentale, différentes techniques d'analyse et de caractérisation des films préparés ont été abordées à savoir :

- Les essais mécaniques de traction.
- Le test de gonflement dans l'eau et dans l'eau en présence de sels de PBS à T= 37°C (température du corps humain).
- L'évaluation du nombre de moles des ε-amino groupes et l'évaluation du taux de réticulation par la méthode d'authentification utilisant le TNBS.
- L'analyse thermique enthalpique (D.S.C.)
- L'analyse par diffraction des rayons-X.

Chapitre I
Les gels polymériques

CHAPITRE I

LES GELS POLYMERIQUES

Les gels polymériques occupent une place de plus en plus importante dans les sciences des matériaux. Le nom « gel » est utilisé pour une grande variété de systèmes comprenant des solutions de polymères ou de particules minérales. La richesse et la diversité de leurs propriétés se manifestent dans plusieurs applications à savoir : les industries agroalimentaires, cosmétique, peintures, pharmacie et autres …etc **[4].**

Ces gels polymériques sont des systèmes tridimensionnels composés d'au moins de deux constituants. L'un, très fortement majoritaire qui est le solvant et l'autre une substance solide qui est dispersée à l'intérieur du solvant.

Le milieu dans son ensemble se comporte comme un solide mou ou une pâte facile à déformer **[5,6].**

I-1. Classification des gels polymériques

Les gels polymériques peuvent être classés en fonction :

1- De la nature du liquide constituant le solvant : **(voir tableau ci-dessous)**

Tableau I.1 : tableau représentant les différents types des gels selon la nature des solvants [7]

Type de gel	hydrogel	Alcogel	Aérogel	Gel hyopique ou organogel
Solvant	Eau	Alcool	air	huile

2- Du mécanisme responsable de la prise en gel. Bien qu'ils soient variés et dépendants du système étudié, on peut schématiquement les classer en deux types : gels physiques ou gels semi-réticulés et gels chimiques ou gels réticulés **[7].**

I-1-1. Les gels physiques

L'agrégation des molécules est réversible. Pour ceux-ci, différents mécanismes participent à la formation d'un réseau réversible ou labile en fonction de paramètres tels que la température, le pH, la force ionique et les contraintes mécaniques. Les liaisons qui constituent les jonctions du réseau sont de nature physique. Elles peuvent être des liaisons hydrogène, de Van der Waals, Coulombiennes ou interactions hydrophobes et ioniques. L'énergie de ces liaisons est de 4 à 30 kJ/mole. Elle diminue avec l'augmentation de la température. Par conséquent, la température de fusion des gels est la température de distruction de ces différentes faibles liaisons **[7, 8].**

Ces systèmes peuvent donc repasser à l'état liquide après modification de ces paramètres, ce qui entraîne la désagrégation du réseau et la redispersion des molécules **[9].** La texture de ces gels est représentée par la figure suivante **(fig. I.1)**



Figure I.1 : schéma représentant le modèle de gélification par zones de jonction : gel physique [9]

I-1-2. Les gels chimiques

Ces gels sont formés par des liaisons covalentes qui mènent à la création d'un réseau permanent de type caoutchoutique. Ces gels peuvent se déformer d'une manière très importante sous l'action d'une force extérieure faible et retrouver leur forme initiale très rapidement lorsque cette force est supprimée **[9].** Leur élasticité est de nature entropique. Elle est directement liée à la conformation des chaînes de polymères sous forme de pelotes statistiques. Ils ont la particularité d'absorber de grandes quantités de liquides pouvant dépasser 10 fois leur poids sec, qu'ils n'expulsent cependant pas sous l'effet d'une pression modérée **[5].** Parmi ces gels, on a la gélatine, le gel de déxtrane et et le gel de l'amidon **[7].** La texture de ces gels est représentée comme suit **(fig.I.2) :**

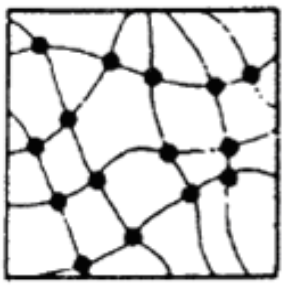


Figure I.2 : schéma représentant le modèle de gélification par jonctions ponctuelles : gel chimique [9]

I-2. Transition sol-gel

En général, lorsque dans certaines conditions de température et de concentration, certaines solutions colloïdales (molécules diluées dans un solvant ou sol) se prennent en masse (solide) poreuse et gonflée plus ou moins élastique **[10,11].** Ce passage de l'état colloïdal à l'état solide conduit à la formation d'agrégats entre les différentes particules présentes dans le milieu. Ce point critique au cours duquel se produit une agglomération entre les molécules est appelé « la transition sol-gel » **[12,13].** A partir de ce moment précis, nous

observons une perte de la fluidité du composé de départ qui se transforme en solide mou **[14].**

Le système passe de l'état visqueux (sol) vers l'état élastique (gel) et la cinétique de prise en gel dans ce cas dépend très sensiblement de la température de trempes **[4,13].**

I-3. Propriétés des gels de biopolymères

La classe des gels de biopolymères constitue l'une des grandes classes de biomatériaux en raison de leur aptitude à fournir une gamme de composés, dont leurs structures et leurs propriétés sont différentes **[15].**

La biocompatibilité, la facilité de mise en œuvre, la fiabilité et la reproductibilité sont les principales propriétés couramment exploitées. Et grâce à ces propriétés, ces gels peuvent être largement utilisés dans le domaine biomédical comme le montre le schéma ci-dessous **(fig. I.3) [16].**

Sous cette classe des gels, on trouve la classe des hydrogels qui peuvent être subdivisés aussi en deux groupes : **[17]**

1- Les gels biostables (pour applications permanentes comme prothèses et organes artificiels)
2- Les gels biorésorbables (après dégradation pour applications temporaires). Ils sont requis pour une durée limitée : le temps de la guérison.

Les hydrogels dégradables biorésorbables sont maintenant utilisés en clinique sous diverses formes : suture, pièces d'ostéosynthèse, systèmes pour la libération contrôlée de principes actifs… etc **[18].**

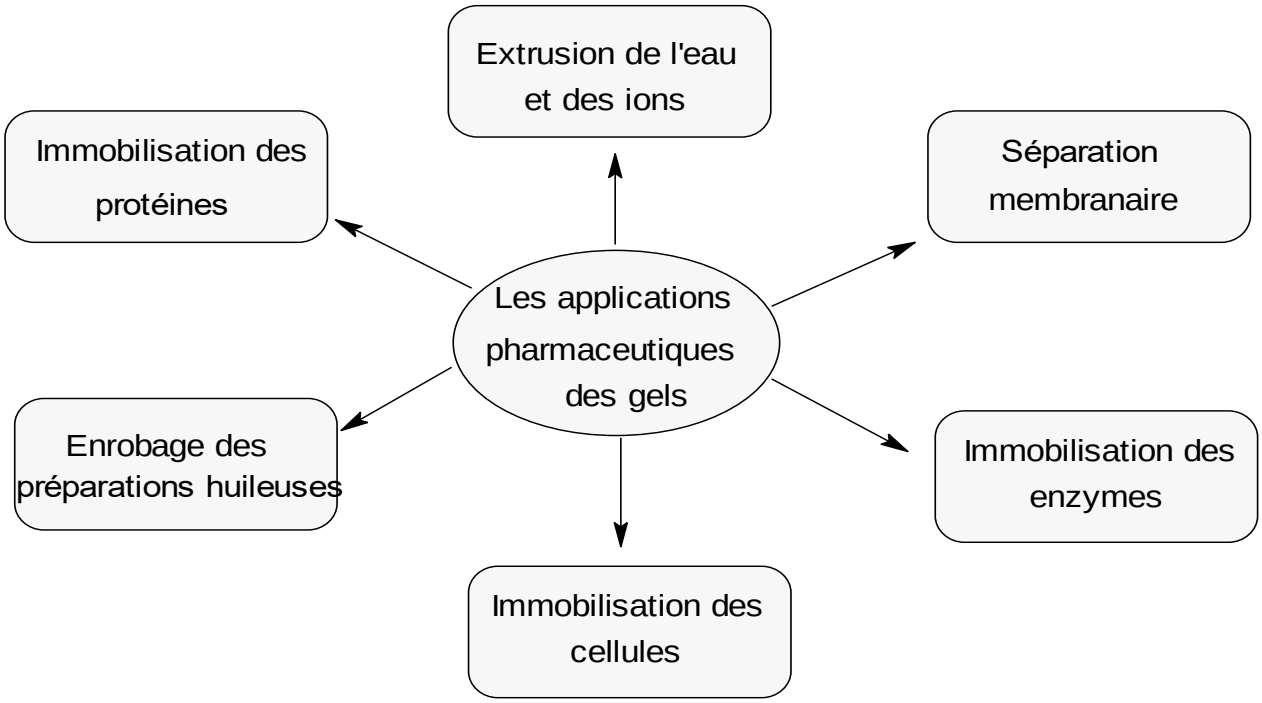


Figure I.3 : schéma représentant les différentes applications biomédicales des gels [16]

I-4. Réticulation des gels

La réticulation ou le pontage est l'introduction des liaisons covalentes inter-moléculaires entre les deux segments des chaînes de polymère. Dans le cas du gel de gélatine, la réticulation se fait entre ses chaînes polypeptidiques **[18].** La réticulation a pour but de créer un réseau macromoléculaire tridimensionnel plus ou moins serré **[19].**

Le taux de réticulation peut être évalué en mesurant son gonflement qui est d'autant plus important que le nombre de ponts intermoléculaires est faible **[20].**

I-4.1. Paramètres contrôlant la réticulation

Les principaux paramètres qui agissent sur la réticulation sont :

- La réactivité des constituants du composé à réticuler avec l'agent réticulant (présence de groupements fonctionnels).

- La composition de cette protéine en acides aminés (nature et quantité).

- La structure tridimensionnelle, c'est-à-dire : la configuration spatiale de la protéine et la présence de ramifications sur les chaînes principales constitutives de la triple hélice **[19, 20].**

I-4-2. Principales réactions de réticulation

On a différentes classes de réticulations **[21, 22]** :

-La réticulation par la présence de groupements fonctionnels (réticulation chimique)

-La réticulation par irradiation ;

-La photo-réticulation;

-La réticulation thermique ;

-La réticulation sous plasma.

Ces différentes classes de réticulation peuvent être établies par différentes méthodes représentées par le tableau suivant :

Tableau I.2 : tableau représentant les différentes méthodes de réticulation des gels polymériques [7]

Types de gels			Méthodes de réticulations		Exemples
Gels polymériques	Gels polymériques synthétiques et gels	**Gels chimiques**	-Réticulation lors de la polymérisation	-Photo polymérisation thermique	-Copolymérisation entre les composés vinyliques

			-Réticulation après la polymérisation		-Réticulation chimique -Photo réticulation par irradiation	-PVA-Aldéhydes - Polymères acryliques
		Gels physiques	Réticulation après polymérisation	-Liaison hydrogène	Cristallisation	-PVA
				-Liaison ionique	-Mixage	-Poly -méthacrylate de sodium
				-Liaison de coordination	-Réaction de chélation	-Poly(vinyl-alcool) -Cu^{2+}
				-Formation d'hélices	-Formation d'hélices	-Agar -Gélatine
				-Liaisons hydrophobes	-Interactions hydrophobes	-Albumine

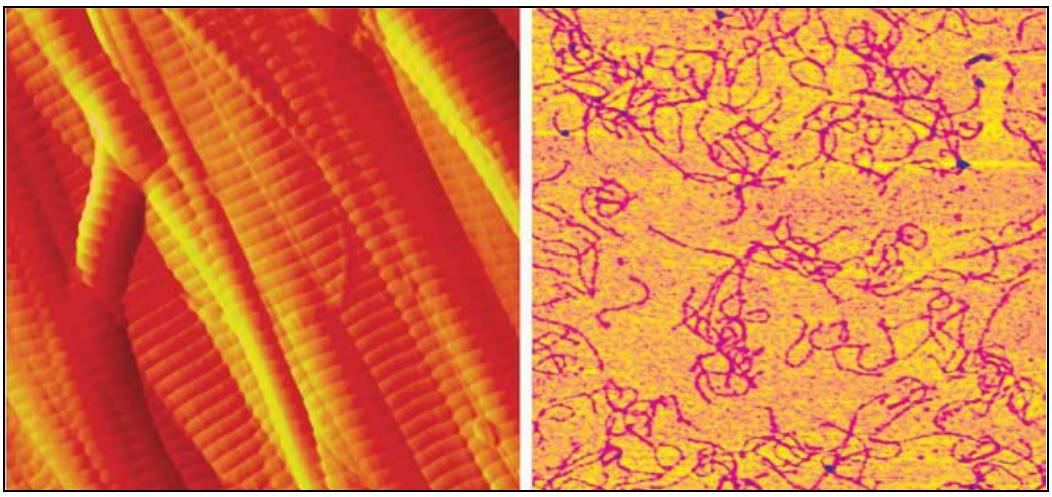
Chapitre II
La gélatine et ses applications biomédicales

CHAPITRE II

LA GELATINE ET SES APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES

La gélatine est une substance protéique pure. Elle est obtenue généralement par hydrolyse acide partielle (type A) ou hydrolyse alcaline partielle (type B) des fibres du collagène 63 représenté par la figure suivante **(fig. I.1) [11].** Comme elle peut être constituée par un mélange des deux types **[23].**

La gélatine peut couvrir une gamme de produits possédant des propriétés différentes



FigureII.1 : images montrant la structure fibreuse du collagène 63 constituant de base de la gélatine [11]

II-1. Composition chimique de la gélatine

Les analyses montrent que la gélatine contient des pourcentages massiques de : 26,4 à 30,5% de glycine ; 14,8 à 18% de proline ; 13,3 à 14,5% d'hydroxyproline ; 11,1à 11,7% d'acide glutamique ; et 8,6 à 11,3% d'alanine. Les autres acides aminés sont en faibles pourcentages comme la tyrosine avec un pourcentage de 0,2% seulement **[24].**

Le tableau suivant donne les valeurs des acides aminés pour les deux types de gélatine et pour le collagène :

Tableau II.1 : Nombre d'acides aminés ($\times$1000 résidus) présents dans les deux types de gélatine et dans le collagène [25]

L'acide aminé	Gélatine type A	Gélatine type B	Collagène
Alanine	112	117	114
Arginine	49	48	51
Aspartine	16	00	16
Acide aspartique	29	46	29
Cistéine	00	00	00
Acide glutamique	48	72	48
Glutamine	25	00	25
Glycine	330	335	332
Hystidine	4,0	4,2	4,4
Hydroxyproline	91	93	104
Hydroxylysine	6,4	4,3	5,4
Isoleucine	10	11	11
Leucine	24	24.3	24
Lysine	27	28	28
Méthionine	3,6	3,9	5,7
Phénylalanine	14	14	13
Proline	132	124	115
Sérine	35	33	35
Thréonine	18	18	17
Tryptophane	00	00	00
Tyrosine	2,6	1,2	4,4
Valine	26	22	22

II-2.Transformation du collagène en gélatine

Ce passage d'un système fibreux très organisé et insoluble dans l'eau, va exiger un clivage des structures d'abord du réseau des tropocollagènes (collagènes précurseurs), puis de

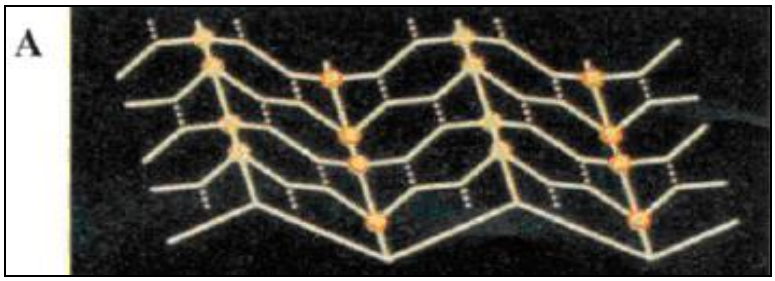
l'unité de base, pour obtenir un système de molécules indépendantes et amorphes, qui constituent la gélatine totalement dispersable dans l'eau **[11].**

La variété des processus chimiques envisageables pour le clivage des structures du polymère implique l'obtention non seulement d'une seule gélatine mais de gélatines très diverses à partir d'un collagène intact bien isolé **(**image **A**- **fig II.3)**. Le clivage par action chimique modérée (milieu faiblement acide à 40°C) se fait selon les étapes suivantes : **[11, 13].**

- Ouverture du tropocollagène en trois chaînes α désorganisées et indépendantes (image **B -fig. II.3).**

- Deux chaînes α désorganisées conservent entre elles une ou plusieurs attaches covalentes et forment une molécule double β. Une chaîne α devient indépendante (image **C -fig. II.3).**

- Trois chaînes désorganisées restent liées par une ou plusieurs covalences et constituent une molécule triple hélice γ (image **D -fig. II.3)**.



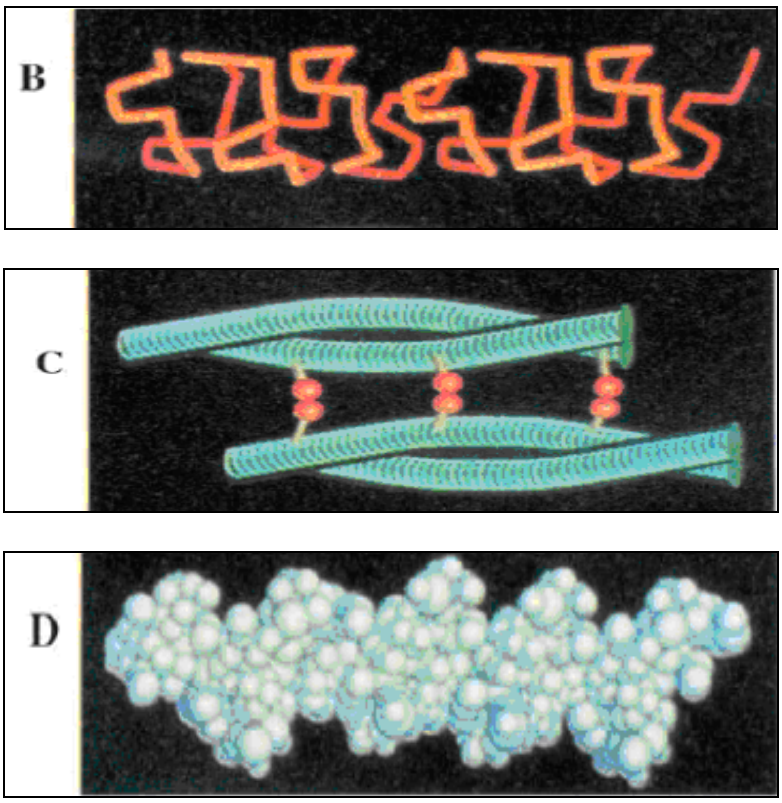


Figure II.2 : schéma représentant les étapes de formation de la triple hélice de la gélatine à partir du collagène [27]

II-3. Structure moléculaire de la gélatine

La molécule de gélatine peut contenir entre 300 et 4000 unités d'acides aminés **[26].** La séquence de ces derniers se présente de la manière suivante -Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro- comme le représente le schéma suivant :

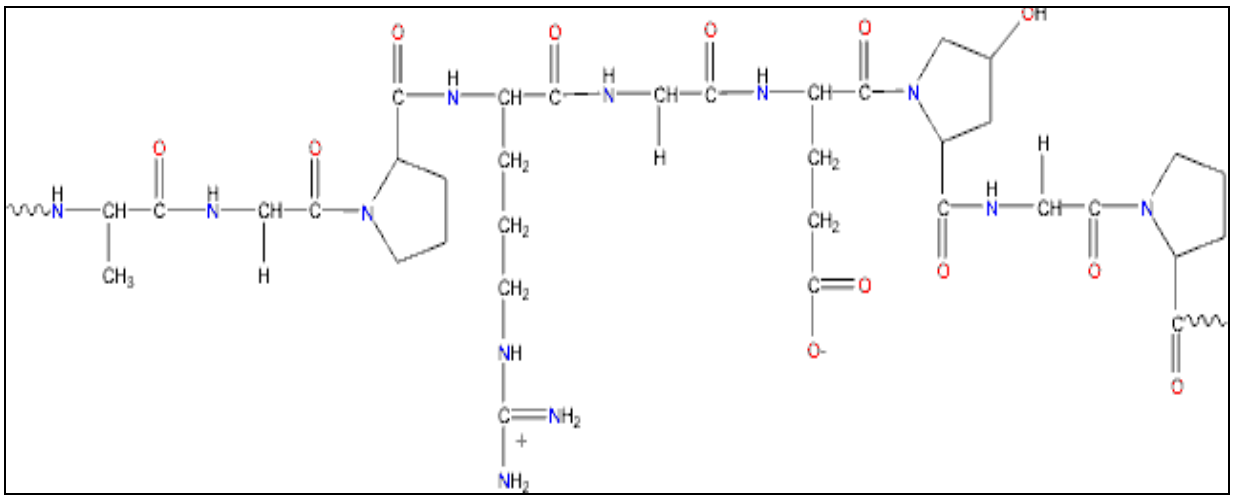


Figure II.3 : représentation chimique de la structure typique de la gélatine [26]

II-4. Configuration de la molécule de gélatine

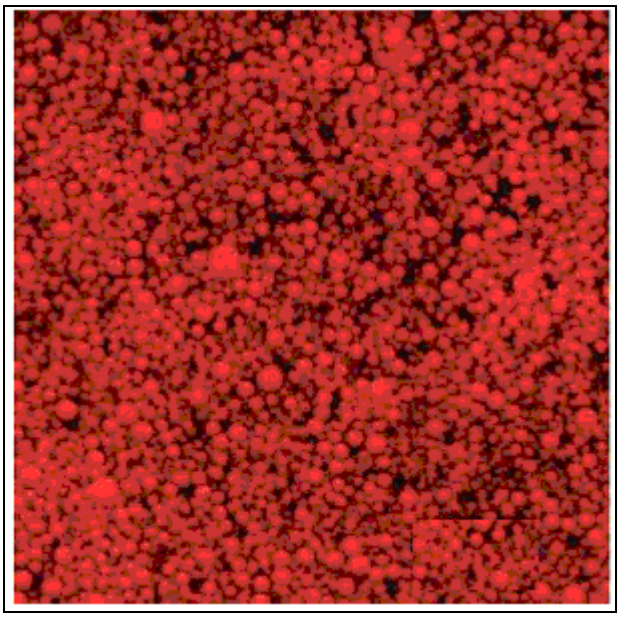
La gélatine est la molécule de collagène dénaturé, dont sa formule générale est :

$-(NH-CHR-CO)_n-$ où R représente le groupement latéral d'un acide aminé. Il y a une vingtaine d'acides aminés différents le long d'une chaîne, mais les séquences se succèdent avec la répétition de certains motifs. En particulier les séquences du type -(Gly-X-Hy-pro)- sont fréquentes (X est un autre acide aminé). La glycine apparaît régulièrement tous les trois résidus **[28].** Chaque chaîne de la triple hélice est elle-même une hélice gauche dont le pas est de 0,9 nm, le pas de l'hélice droite étant environ dix fois plus grand, soit 8,6 nm. La structure de la triple hélice est stabilisée par des liaisons hydrogène entre les groupements CO et NH des chaînes adjacentes. L'eau intervient également dans la stabilisation de la triple hélice placée en position interstitielle, entre les trois chaînes, elle forme des liaisons hydrogène avec les chaînes protéiques. La masse moléculaire d'une chaîne est d'environ 100000 Dalton. Le bâtonnet de collagène en solution diluée se dénature par élévation de température vers 36°C. Au-dessus de cette température, les chaînes se trouvent en conformation pelote **[4].**

II-5. Gel de gélatine

C'est l'un des gels les plus connus, mais le moins bien compris. Le mécanisme de gélification est très simple : la formation des triples hélices est le processus qui engendre la prise en gel. La formation du gel est un processus cinétique : en baissant la température des hélices qui sont nucléées tout le long des chaînes protéiques, associant les brins trois par trois. Ainsi se créent les jonctions. Cette nucléation rapide favorise la formation de défauts et de boucles qui interrompent les séquences d'hélices. Il en résulte une mauvaise stabilité thermique des hélices (les séquences étant courtes) et les gels redeviennent fluides à des températures très

inférieures à 36°C. Le gel n'est pas en équilibre thermodynamique : cette structure très désordonnée va en permanence se réarranger pour tendre vers l'équilibre qui correspond à la renaturation complète des triples hélices du type collagène, sans jamais y parvenir. La structure que l'on peut observer par microscopie électronique représentée par la figure suivante **(fig. II.4)** montre en effet des grains de dimensions très variables compris entre 10 et 100 nm **[18].**



FigureII.4 : image montrant la microscopie électronique

d'un gel de gélatine à l'équilibre [18]

II-5-1. Effet de la température sur les gels de gélatine

Les gels de gélatine fournissent un exemple des systèmes formant des gels thermiquement et mécaniquement « mous » très sensibles à la température et au cisaillement. Leur mécanisme de gélification s'explique simplement à partir du changement de conformation pelote-hélice des chaînes protéiques, induit par l'abaissement de la température. Les hélices s'associent naturellement par trois (conformation du collagène natif). Ce qui entraîne la formation du réseau gélifié **[29].**

II-6. Propriétés physico-chimiques de la gélatine

Les propriétés de la gélatine, comme composé à poids moléculaire élevé et à chaînes rigides, sont similaires à celles des polymères synthétiques à chaînes rigides. La gélatine, dans des solutions aqueuses, prend des conformations « coil » ou « pelote » à des températures élevées **[30].**

Sous des conditions spécifiques de température, solvant et pH, la gélatine peut avoir une flexibilité suffisante lui permettant de prendre plusieurs conformations. Ceci lui permet de varier toutes ses caractéristiques fonctionnelles dépendant de la structure moléculaire **[14,31].**

En plus, la gélatine qui est similaire à des hauts polymères synthétiques, montre une large distribution de poids moléculaire **(fig. II.5 et fig. II.6).**

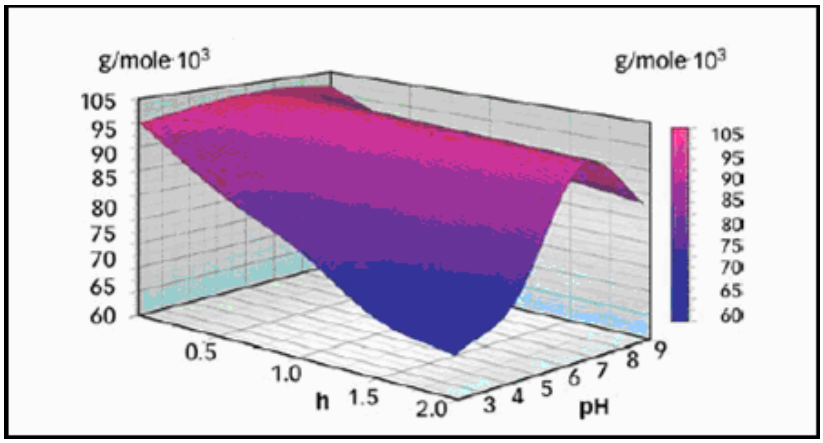


Figure II.5 : graphe montrant l'influence du pH sur la distribution du poids moléculaire de la gélatine [18]

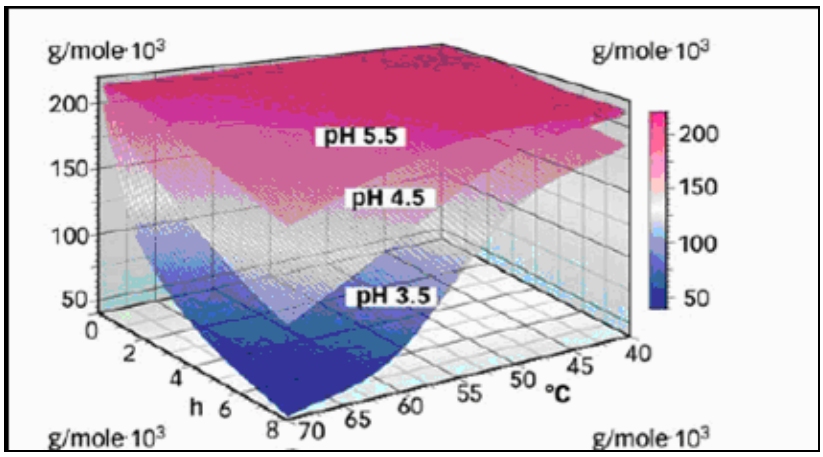


Figure II.6 : graphe montrant l'influence de la température sur la distribution du poids moléculaire de la gélatine [18]

II-6-1. Point isoélectrique

Les transformations de gélatine ne sont pas tout à fait identiques en milieu alcalin et en milieu acide. La différence essentielle se situe dans la valeur du point isoélectrique de la gélatine obtenue. Le point isoélectrique de la gélatine A se trouve entre 8,5 et 9 du fait que le traitement acide conserve les groupements aminés de la glutamine ainsi que ceux des restes aspartiques. Le point isoélectrique de la gélatine B est de l'ordre de 4,8-5 du fait de l'élimination de ces groupements aminés par traitement alcalin **(fig. II.7).**

Cela a son importance d'une part parce qu'au point isoélectrique la solvatation des molécules est à son minimum et qu'il y a alors risque de floculation, et d'autre part parce qu'on ne peut mélanger deux polymères de charges différentes sans risque de précipitation.

- La gélatine A n'est utilisable qu'en milieu acide (tartrique par exemple)

- La gélatine B est utilisable à un pH voisin de la neutralité **[23].**

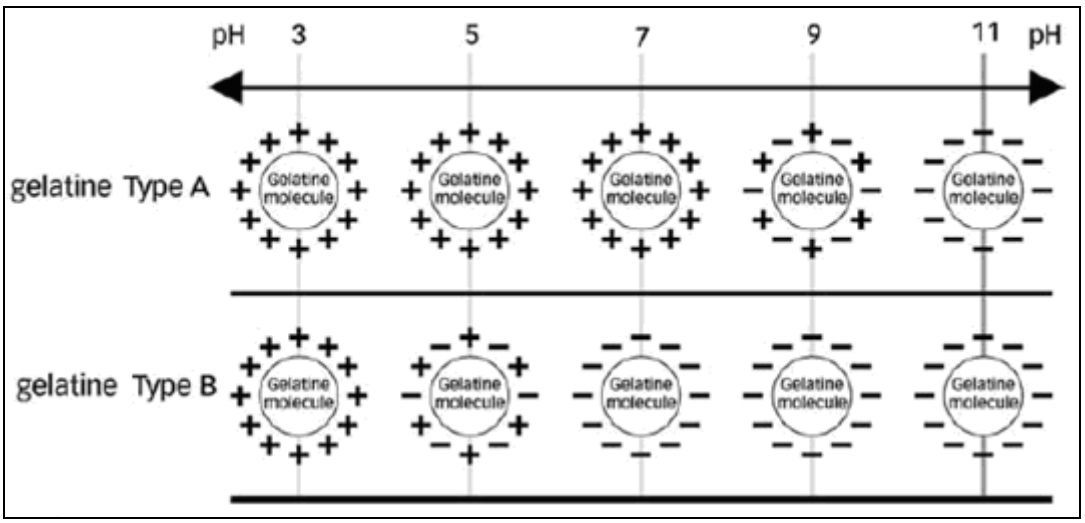


Figure II.7 : schéma montrant l'effet du pH sur la distribution des charges électriques pour les types A et B de gélatine [18]

II-6-2. Solubilité et gonflement

La gélatine est relativement insoluble dans l'eau froide. Lorsque ses grains sont ajoutés à l'eau froide (température ambiante), ils absorbent de l'eau jusqu'à 100 fois leur poids initial et se gonflent rapidement **[23] (fig. II.8).** Mais elle devient rapidement soluble dans l'eau chaude.

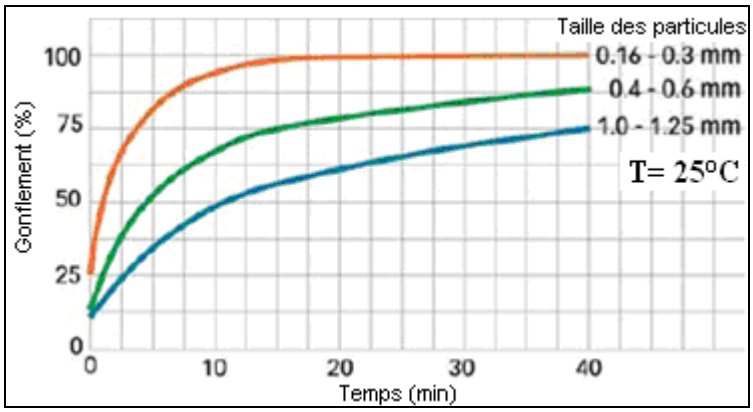


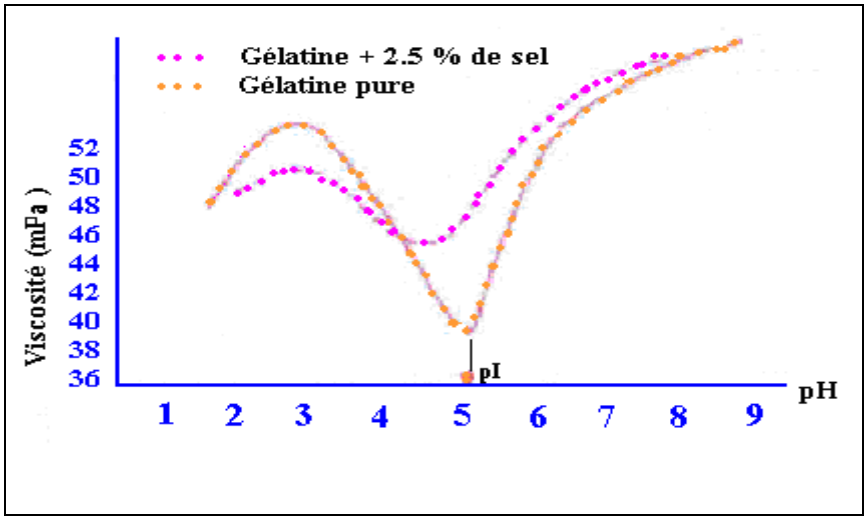
Figure II.8: courbes montrant la variation du gonflement en fonction du temps et en fonction de la taille des particules de la gélatine [23]

A T= 40°C, les grains se solubilisent jusqu'à la formation d'une solution homogène. La vitesse de solubilisation dépend de la température, de la concentration et de la taille des particules

[32]. La gélatine est aussi soluble dans l'acide acétique, le trifuoroéthanol, le glycerol, l'éthane-1,2- diol et quelques autres solvants organiques **[11].**

II-6-3. Viscosité

La viscosité de la gélatine en solution augmente avec la concentration et diminue avec la température. La présence des sels libres dans la solution diminue la viscosité. Si le pH est le point isoélectrique de la gélatine, la viscosité passe par un minimum**,** et c'est quelque soit la concentration de la solution utilisée, comme c'est représenté par les deux courbes suivantes **(fig. II.9)**



FigureII.9 : graphes montrant l'effet du pH sur la variation de la viscosité pour la gélatine pure et pour la gélatine additionnée au sel [18]

La nature macromoléculaire et la viscosité de la solution à différentes températures **(fig. II.10)** et concentrations **(fig. II.11)** exhibent des propriétés rhéologiques de nature Newtonienne qui sont initialement relatives à la distribution du poids moléculaire **[23].**

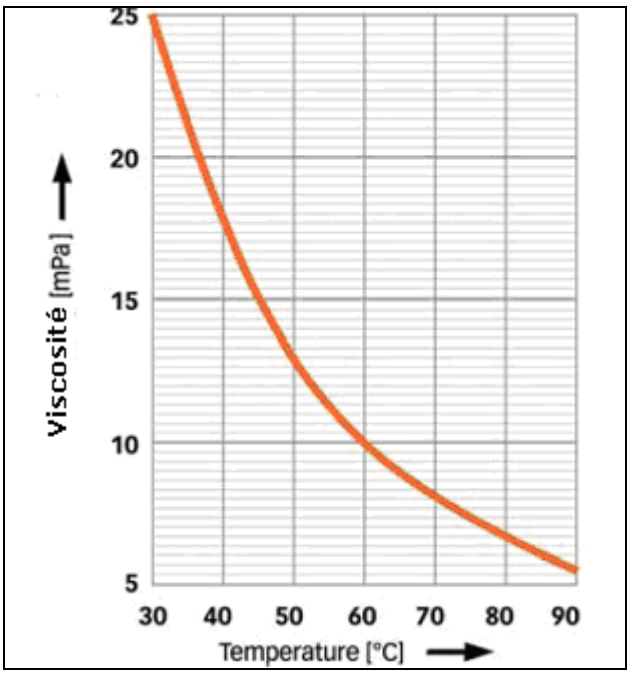


Figure II.10 : courbe montrant l'influence de la température sur la viscosité [18]

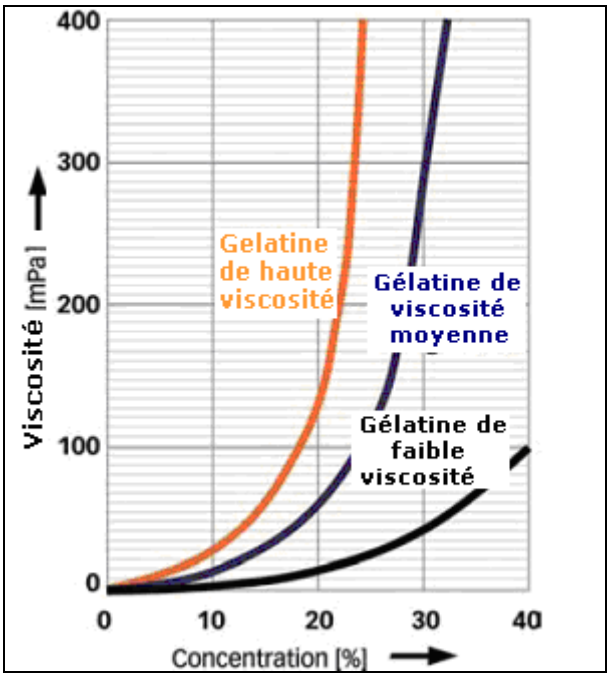


Figure II.11 : courbes montrant l'influence de la concentration sur la viscosité [18]

II-6-4. Pouvoir gélifiant ou force de gel

La gélatine présente des propriétés gélifiantes si ses particules sont capables de s'assembler pour former un réseau tridimensionnel poreux au sein duquel le liquide de dispersion est immobilisé.

Pour former ce réseau, les molécules interagissent fortement entre elles dans des zones limitées appelées zones de fixation ou zones de jonction. La solidité et le nombre de zones de fixation déterminent les caractères rigides et réversibles d'un gel **[32,33].**

Parmi les critère les plus importants qui déterminent la qualité de la gélatine ; c'est le degré de bloom qui se trouve généralement entre 50 et 300. Il caractérise le filmogène et le pouvoir gélifiant de la gélatine (degré de bloom élevé implique pouvoir gélifiant élevé) **[32].** Ce pouvoir dépend de la concentration et de la force intrinsèque de la gélatine qui a la capacité de former des gels thermoréversibles en fonction de la température. Cette propriété est très importante pour étudier les applications de la gélatine **[18].**

II-6-4-1. Signification du degré de bloom

C'est la force maximale mesurée lors de la pénétration d'un cylindre standardisé de **½** pouces de diamètre à une profondeur de 4 mm avec une vitesse de 1 mm/seconde pour un gel de 6,67% naturé pendant 18 heures à 10°C dans un flacon spécifique de gélatine. C'est l'essai préconisé par la pharmacopée mais on peut aussi faire des solutions de concentrations croissantes de la gélatine à étudier et noter à partir de quelle concentration il y a prise en gel **[23].**

Cette définition et ces conditions sont normalisées sous référence BS757 du British Standard, la gélatine est alors graduée et marquée en grades ou force de bloom décrit par le tableau suivant :

Tableau II.2 : tableau représentant les conditions de normalisation selon British

Standard [5]

	Gélatine type A	Gélatine type B					
Bloom ou rigidité	100- 120	125- 140	150- 170	175- 190	200- 220	225- 240	250- 270
Viscosité (m Pa)	19-23	20-27	30-38	39-41	41-48	42-50	42-50
pH	5,4-6,2	5,4-6,2	5,4-6,2	5,4-6,2	5,4-6,2	5,4-6,2	5,4-6,2
Humidité (%)	12 max	12 max	12 max	12 max	12 max	12 max	12 max
Clarté	>94	>94	>94	>94	>94	>94	>94
point isoélectrique	7-9,0	4,7-5,1	4,7-5,1	4,7-5,1	4,7-5,1	4,7-5,1	4,7-5,1

II-6-4-2. Mécanisme de gélification de la gélatine

La pénétration du soluté à l'intérieur de la matrice du gel de gélatine forme ce qu'on appelle gel colloïdal semi solide. Ce phénomène dépend des conditions de l'environnement comme le pH, la température, le champ électrique, la lumière, la pression, la force ionique et la nature du solvant **[5].**

Le mécanisme de gélification peut être exprimé par les étapes suivantes : (**fig. II.12)**

a : Diffusion du solvant.

b : L'agrégation des particules au sein du solvant.

c : La gélification par formations des amas et des réseaux réticulés.

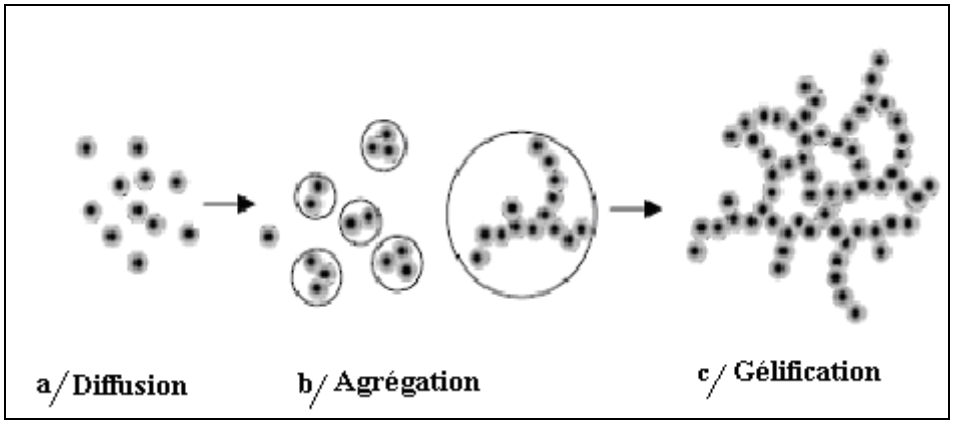


Figure II.12 : schéma représentant

le phénomène de gélification de la gélatine [5]

II-6-4-3. Conditions d'une gélification complète [32]

-La durée : le gel se forme immédiatement à 10°C, mais il faut environ 16 heures pour atteindre la gélification maximale.

-La concentration qui doit dépasser 0,8% au minimum. Cette dernière est appelée la concentration critique de gélification. D'autre part, la force de gel est une fonction non linéaire de la concentration.

- Le pH et la température ; plus le pH est bas et la température est élevée, plus la formation de gel est faible. Par contre, une fois le gel est formé, il est peu sensible à l'acidité.

- Le cisaillement, avant gélification : il diminue la force de gel.

- La présence de soluté : le sel diminue légèrement la force du gel, alors que la présence de sucre l'augmente.

II-7. Critères de choix de la gélatine en chimie pharmaceutique

II-7-1. Pouvoir épaississant [32,33]

La gélatine présente des propriétés épaississantes lorsque ses molécules ne peuvent pas s'associer fortement entre eux. Leur simple présence gêne la mobilité du liquide dans lequel elles sont dispersées et conduit à une augmentation de la viscosité de la solution.

Ainsi ses molécules peu déformables rigides forment au repos des édifices stabilisés par des interactions faibles (liaisons hydrogène, forces de Van der Waals).

En dessous de la concentration critique (0,8 %), la gélatine peut être utilisée comme agent épaississant.

II-7-2. Pouvoir filmogène [11]

Lorsqu'une solution de gélatine est étalée en fine couche sur une surface et passe de l'état sol à l'état gel, elle forme un film. Cette propriété est mise à profit dans la fabrication de capsules dures et molles et en microencapsulation des principes actifs.

II-7-3. Pouvoir émulsifiant [30,31]

En tant que protéine, la gélatine s'adsorbe à l'interface des gouttelettes d'huiles et ainsi stabilise l'émulsion de type huile/eau. Cette stabilisation est accentuée par la propriété de gélification à l'interface. Ce pouvoir émulsifiant de la gélatine lui permet d'obtenir, par brassage, une dispersion homogène dans un mélange de constituants naturellement non miscibles.

II-7-4. Pouvoir foisonnant [11]

Le pouvoir foisonnant de la gélatine permet d'augmenter, dans de fortes proportions, le volume d'un mélange d'ingrédients, à condition qu'il comporte de l'eau. La phase gazeuse ou les bulles d'air créées par battage du mélange sont capturées dans des microbilles de gélatine et maintenues dans un état de dispersion stable.

II-7-5. Pouvoir stabilisant [11,32]

La prise en gel permet la stabilisation et la protection des solutions colloïdales et des émulsions. Le pouvoir stabilisant de la gélatine est souvent supérieur à celui des autres polymères naturels.

II-7-6. Pouvoir moussant [11,32]

La gélatine possède également des propriétés tensioactives qui vont la conduire à s'adsorber à l'interface gaz/ eau, puis à stabiliser la mousse par gélification en surface.

II-8. Applications pharmaceutiques

A cause de ses propriétés technologiques et biologiques, la gélatine est considérée comme un très bon excipient pharmaceutique pour la synthèse des capsules, des suppositoires, comme épaississant pour les formes liquides, comme agent collant pour l'augmentation de l'adhésion et de la viscosité, pour l'enrobage des tablettes en combinaison avec les sucres, comme excipient pour les préparations dentaires, dans la préparation des gels de protection des membranes de la muqueuse buccale, pour l'encapsulation des vitamines, pour la synthèse industrielle des éponges hémostatiques…etc **[34, 35].**

Et grâce à sa biodégradabilité et sa biocompatibilité avec les milieux physiologiques, Elle peut être utilisée en cas d'urgence et en opérations chirurgicales pour la préparation du sérum sanguin. Comme elle peut être utilisée, aussi, en photographie médicale (scanner).

Et jusqu'à présent il n'y a aucun biopolymère qui a remplacé la gélatine dans ses applications pharmaceutiques et médicamenteuses **[18].**

II-9. Exemples des applications

II-9-1. Les capsules de gélatine

Presque 90% de la gélatine pharmaceutique se dirige vers la fabrication des capsules et des gélules. D'une part elle protège les médicaments des effets néfastes de la lumière et de l'oxygène atmosphérique, la contamination et le développement microbien **[11,36].** D'autre part, la gélatine permet de lier les principes actifs du médicament et de prolonger leur durée de conservation. Grâce à une sélection et un dosage rigoureux, la gélatine peut même contrôler la vitesse de libération des principes actifs, soit en l'accélérant, soit en la ralentissant (effet retard) **[37].**

Les comprimés enrobés de gélatine représentent un nouveau progrès technologique, l'enrobage de gélatine facilitant l'ingestion du comprimé par les patients **[38].**

II-9-2. Les substituants du plasma

Les substituants du plasma ont été utilisés en urgence médicale pour le remplacement du sang perdu, jusqu'à ce que le corps puisse lui-même régénérer le sang. Cette gélatine utilisée est de bloom élevé, d'un poids moléculaire de 160 à 180000 $g.mol^{-1}$. Elle subit un traitement thermique, puis plusieurs modifications en utilisant différents réactifs chimiques comme le glyoxal qui réagit avec l'amine terminale de la lysine, l'acide succinique anhydride qui conduit à la formation de l'acide carboxylique des amides par la réaction du groupement amino de la lysine avec les succinates, et le phényldiisocyanate suite à une réticulation des peptides avec la formation des structures uréiques **[39].**

II-9-3. L'encapsulation des vitamines

La vitamine A et la vitamine E doivent être utilisées sous forme liquide ou poudre. Donc elles sont protégées par encapsulation de la gélatine contre l'effet de la lumière et de l'oxygène atmosphérique qui agissent sur la stabilité des acides aminés **[40].**

On utilise la gélatine de type A ou de type B de bloom égale à 90 à 140. On obtient des formes galéniques sous forme de poudre dont les diamètres des particules sont de 200 à 300 micromètres. **(fig. II.13)** La présence de gélatine rend ces formes stables qu'on peut les transformer en tablettes avec ou sans d'autres additifs **[18].**

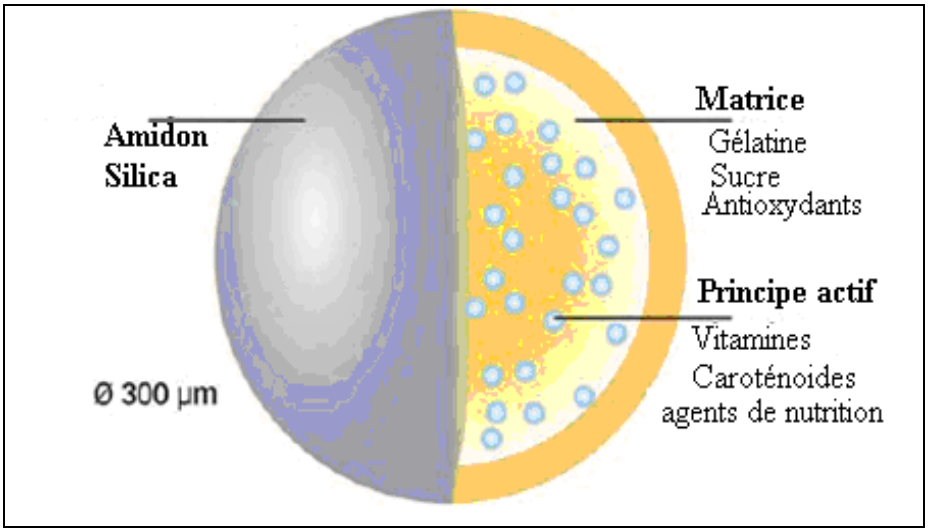


Figure II.13 : schéma représentant le modèle de l'encapsulation des principes actifs par la gélatine [18]

II-9-4. L'immobilisation

Cette technique concerne la fixation des molécules sensibles ou à poids moléculaire très faible sur un support de gélatine ; cas des principes actifs, des enzymes, des antibiotiques **(fig. II.14),** des anticorps **(fig. II.15)** et même des principes actifs à libération prolongée **[41].**

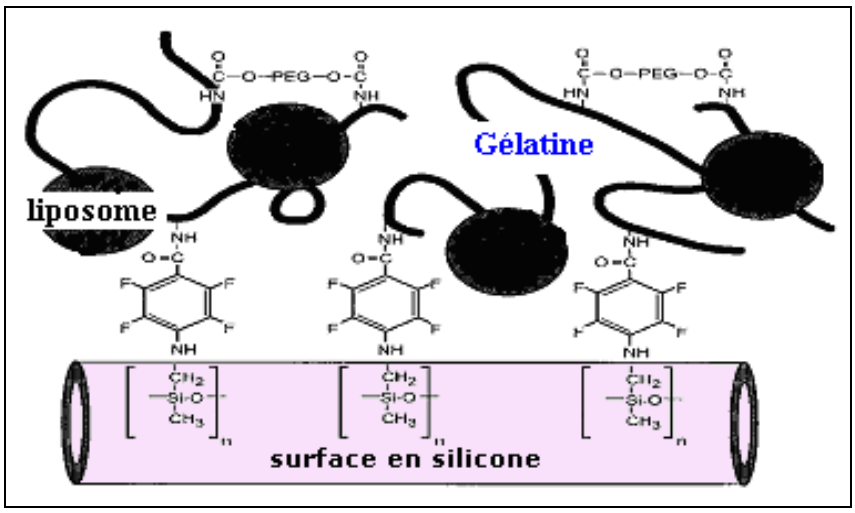


Figure II.14 : schéma représentant la fixation d'antibiotiques sur les liposomes par l'intermédiaire d'une molécule de gélatine [41]

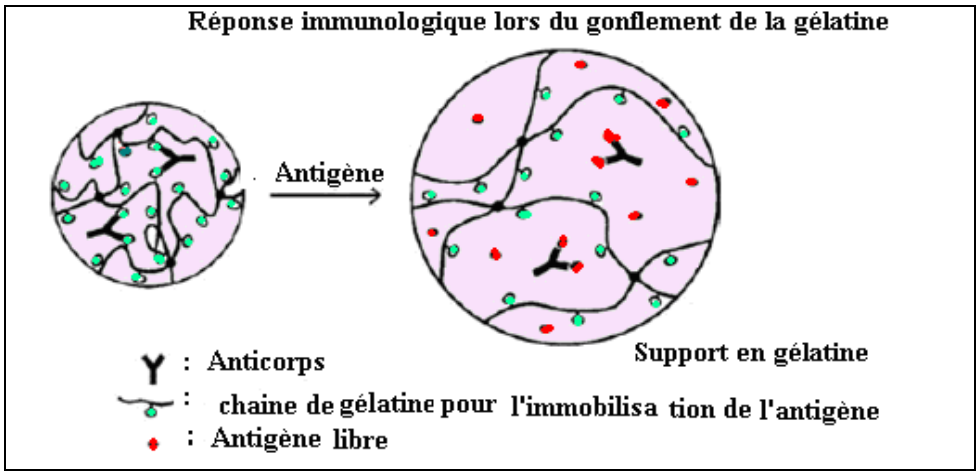
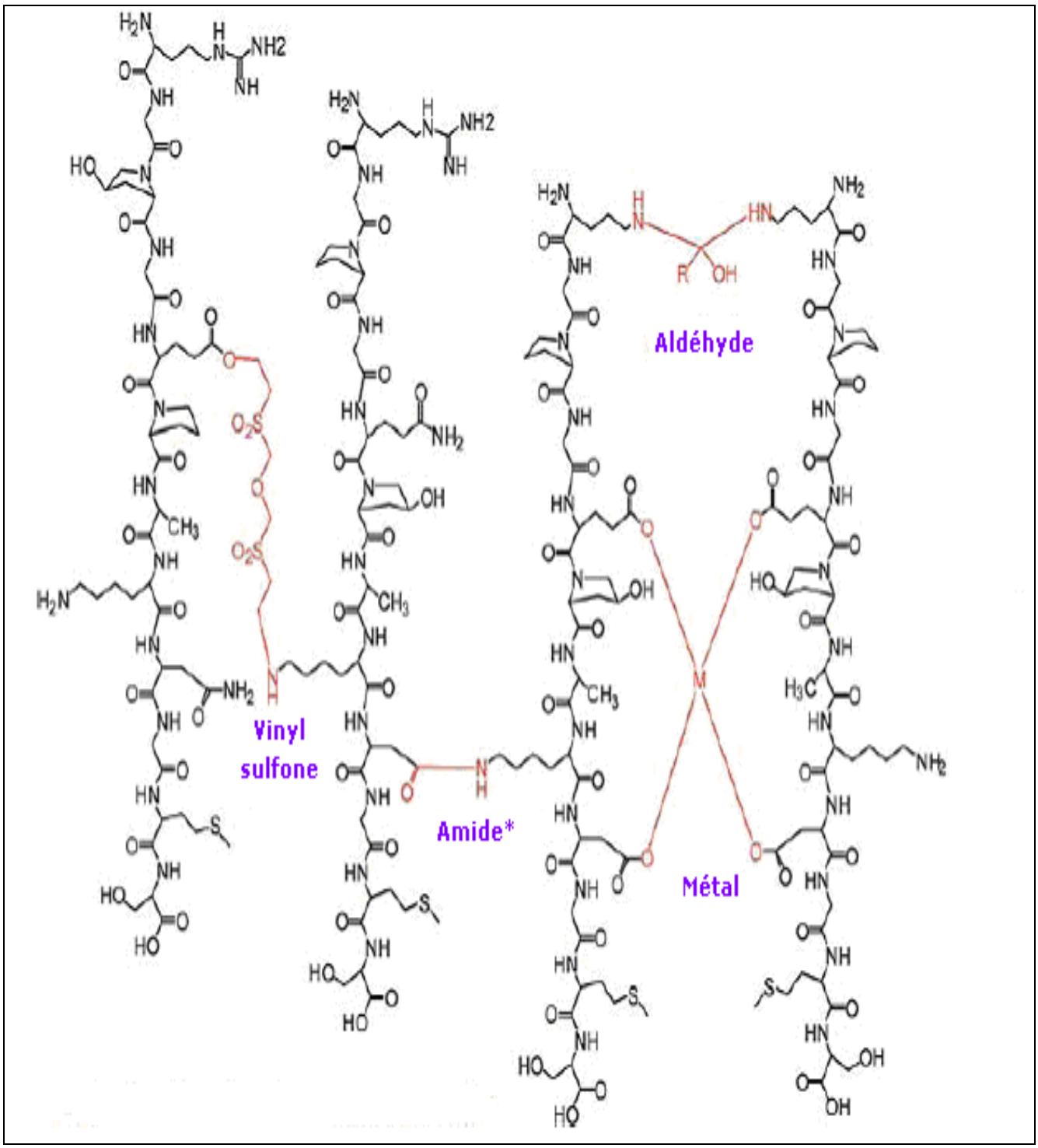


Figure II.15: schéma représentant la technique d'immobilisation d'antigènes et d'anticorps sur un support de gélatine -Réponse immunologique [5]

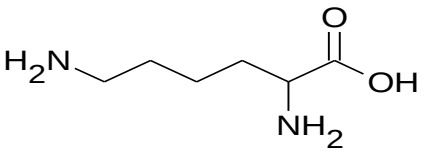
II-10. Réticulation chimique de la gélatine

Cette macromolécule se compose d'unités d'acides aminés actifs et de groupements latéraux fonctionnels et/ou réactionnels responsables de la réticulation chimique. Ces derniers sont : le groupement amine ($-NH_2$), le groupement carboxyle (-COOH) et le groupement hydroxyle (-OH) **[42].** Ces groupements peuvent réagir avec des réactifs mono et bifonctionnels pour former de nouvelles liaisons : vinyl sulfone, amide, métal et liaison aldéhyde **(fig. II.16)**. Ce qui entraîne une variation des propriétés physico-chimiques de la matrice de départ **[11].**

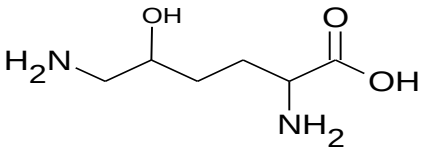


FigureII.16 : schéma représentant les différents types des liaisons formées entre les chaînes peptidiques de la gélatine par réticulation chimique [18]

Récemment, il a été confirmé que la formation de réticulât se fait à partir de l'amine des unités de la lysine et de l'hydroxylysine **[43, 44].**



La lysine

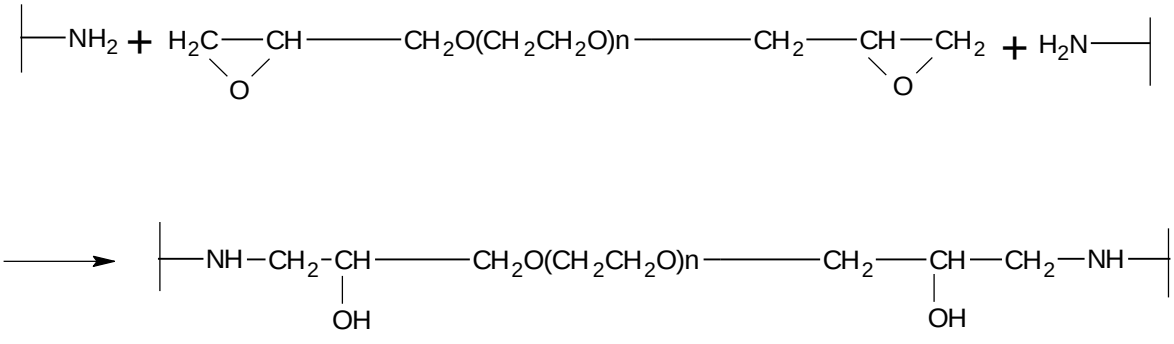


L'hydroxylysine

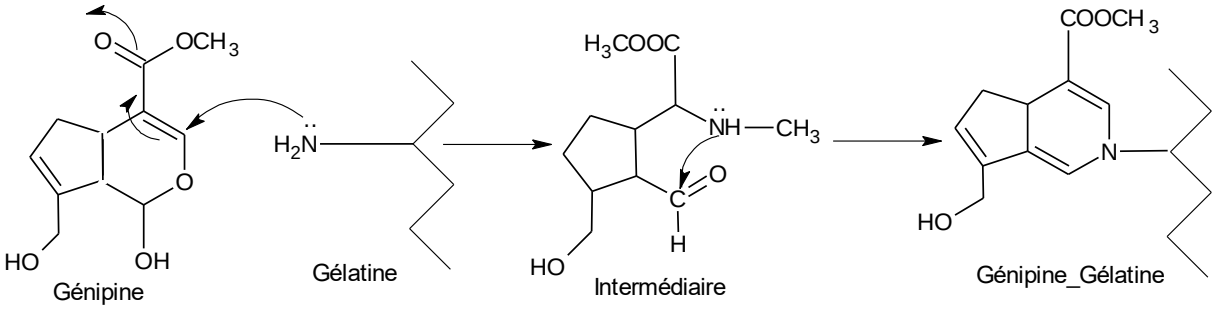
II-11. Principaux agents de la réticulation chimique de la gélatine

- Les aldéhydes (voir partie résultats et discussions)

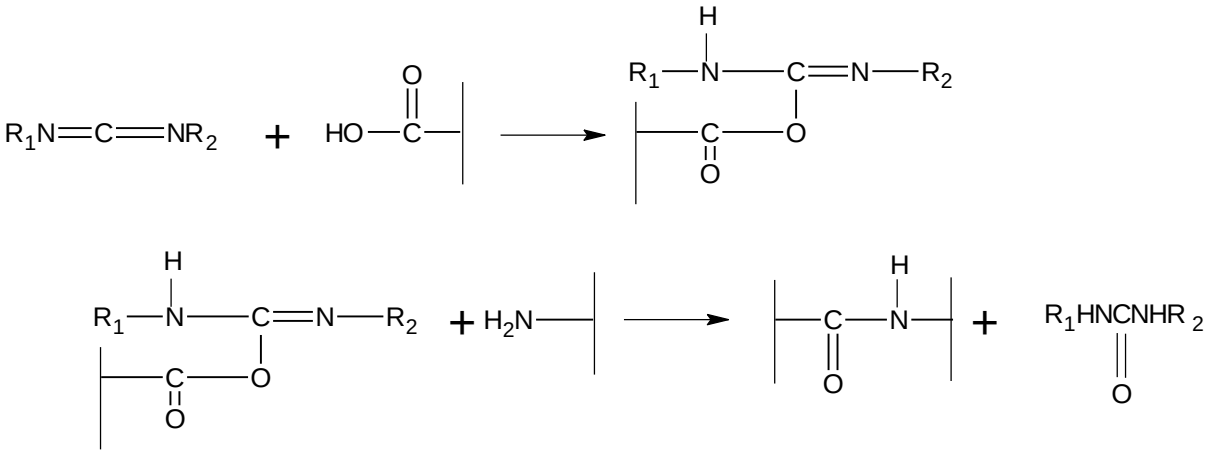
- Les composés époxydes **[45] :**



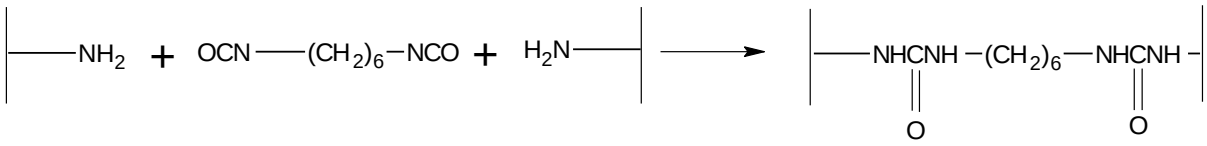
- La génipine **[46] :**



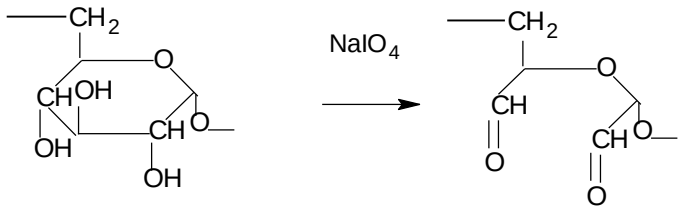
- Le carbodiimide soluble dans l'eau (WSC) **[47] :**



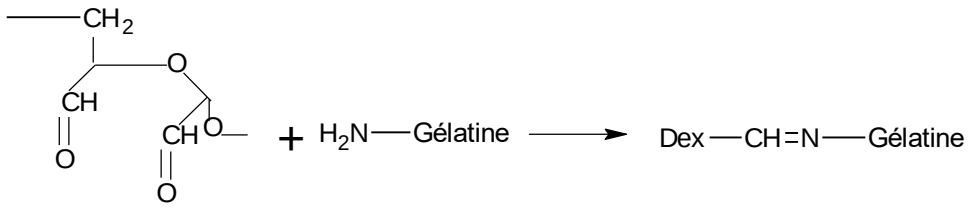
- La réticulation par le diisocyanate d'héxaméthylène (HMDI) **[7]**:



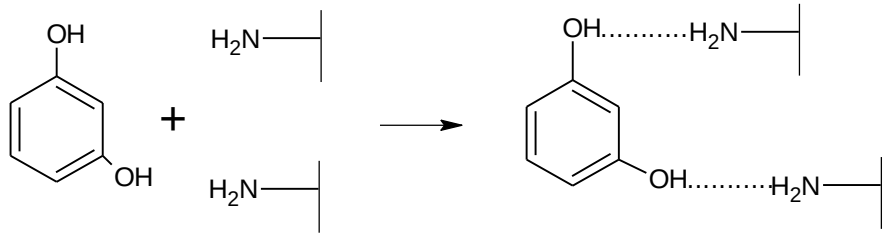
- Les oses, cas du déxtrane **[48] :**



Dialdéhyde_dextrane



- Les phénols, cas du résorcinol **[49] :**



Etablissement d'un pont hydrogène

Chapitre III

Partie expérimentale

CHAPITRE III

PARTIE EXPERIMENTALE

III-1. Matériels et méthodes:

III-1-1. Matériels

Gélatine animale en poudre de type B (pharmacie Baille, 225), pI = 5,7

Gélatine végétale en poudre de type B (pharmacie Baille, 300), pI = 5,9

Glutaraldéhyde (50% en masse dans l'eau) (Aldrich)

TNBS : acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (5% en masse dans l'eau) (Sigma)

PBS : solution tampon de phosphate, pH = 7,4(Bio-Rad)

$NaHCO_3$ (4% dans l'eau) (Sigma)

HCl (6N) (Sigma)

Ether éthylique (GIFRER-BARBEZAT)

III-1-2. Méthodes

III-1-2-1. Préparation de films secs de gélatine

Diverses études bibliographiques ont été consacrées à la préparation des films à partir de la gélatine. Il a été reporté que ces films sont préparés à partir des solutions aqueuses sur des supports hydrophobes tels que le PEHD, le téflon, le polystyrène …etc **[50-52].**

Dans notre cas, la méthode suivie est celle décrite par Bigi. **[50].**

Les films obtenus selon cette technique sont préparés par une hydrosolubilisation à 5% en masse de gélatine à une température T = 40°C. Les supports choisis sont des boites de Petri en polystyrène.

Pour éviter la biodégradation de la gélatine provoquée par les micro-organismes, on ajoute 1mg d'antimicrobiens d'hydrazide de sodium (NaN_3) **[50].**

Pour cela ; 5g de gélatine sont versés dans un bêcher contenant 100 ml d'eau distillée, à température ambiante. L'eau est absorbée au bout de 30 min. Les grains gonflent.

Ensuite, le tout est placé dans un bain-marie à une température T = 40°C, sous une faible agitation magnétique pendant 30 min.

Une fois que la solution obtenue devient limpide, un volume de 13 ml est prélevé à l'aide d'une éprouvette graduée puis versé dans une boite de Petri en polystyrène de diamètre 9,5cm.

Le séchage se fait à l'air libre et à température ambiante pendant 4 jours.

III-1-2-2. Réticulation des films de gélatine par le glutaraldéhyde

La réticulation se fait directement sur les films de gélatine secs déjà préparés **[50].**

Après séchage, les films sont détachés et relevés de leurs supports. Puis ils sont étalés dans des boites de Pétri en verre.

Ensuite, un volume de 15 ml d'une solution de glutaraldéhyde est versé au dessus. Au bout de 24 heures, les films sont rincés cinq fois à l'eau distillée et le séchage se fait à l'air libre à température ambiante pendant 4 jours.

Les concentrations volumiques choisies de glutaraldéhyde sont : 0,5 ; 1,0 ; 1,5 ; 2,0 ; 2,5 et 3,0 %.

III-2. Caractérisation des films

III-2-1. Essais mécaniques de traction

Le but de ces essais est d'enregistrer les courbes contraintes-déformation de plusieurs films préparés à partir de différentes formulations à différentes concentrations de glutaraldéhyde.

Le module de Young, la déformation et la contrainte à la rupture mises en jeu pour rompre l'échantillon seront calculés pour tous les échantillons étudiés **[53].**

A partir des valeurs trouvées et de l'allure de la courbe obtenue **(fig III.1)**, on peut déterminer la nature et le comportement du matériau étudié (gélatine) du point de vue rigidité, résistance à la rupture, plastification…etc.

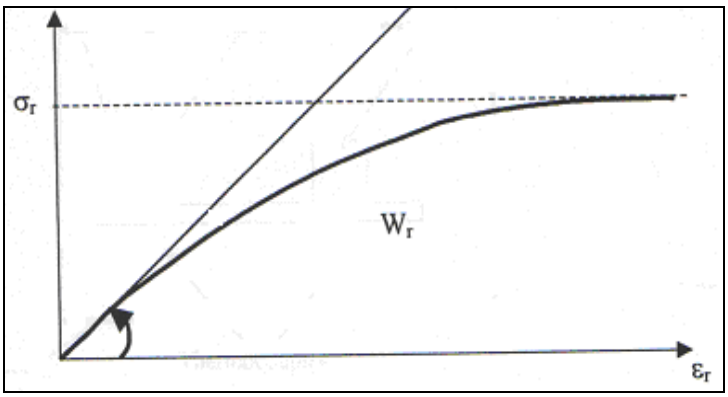


Figure III.1 : le graphe typique contrainte-déformation

d'un polymère amorphe [53]

L'appareil utilisé est de type Zwick/ Roell Z.0.1

Les échantillons soumis au test sont coupés sous forme d'éprouvettes rectangulaires de 50 mm de longueur, de 20 mm de largeur et de 0,1 mm d'épaisseur.

L'échantillon est placé entre les deux mors de l'appareil. Le démarrage s'effectue automatiquement à une vitesse de 5 mm/min jusqu'à ce que la rupture de l'échantillon soit atteinte. A ce moment, la traverse s'arrête et la courbe force-allongement est alors enregistrée sur un ordinateur lié à l'appareil, puis les valeurs seront converties en courbes: contraintes-déformations.

Chaque essai est répété trois fois pour chaque film.

Les paramètres σ_r, ε_r et Wr et E sont déduits à partir des courbes. **(voir annexe 1)**

III-2-2. Essai de gonflement dans l'eau

C'est l'une des caractéristiques les plus importantes des gels. Il peut être expliqué par la pénétration graduelle de l'eau dans les particules solides, suivie par la plastification et ensuite le gonflement. D'autre part, la variation de quelques paramètres tels que le solvant,

la température, la présence de sels, la concentration et le pH, provoque la rétraction du matériau jusqu'à ce que l'équilibre thermodynamique soit atteint. Ce dernier est appelé équilibre de gonflement **[54].**

Il a aussi été indiqué que sous l'action d'un liquide, un composé macromoléculaire peut subir une augmentation de volume désignée par le nom de gonflement.

Celui-ci peut prendre, dans certains cas, un caractère de gonflement illimité, amenant la dispersion à l'état individuel des macromolécules : c'est le phénomène de dissolution. Cependant bien souvent, les composés macromoléculaires demeurent insolubles en subissant seulement un gonflement limité **[19].**

Le taux de gonflement maximal dans les systèmes polymériques est donné sous sa forme simplifiée comme suit : $$G = \frac{V_g}{V_s} = \frac{1}{V_{équi}}$$ **[55]**

Où:

Vg: volume de la matrice gonflée du polymère

Vs: volume de la matrice non gonflée du polymère

$V_{équi}$: La fraction de volume à l'équilibre

Ce test est réalisé à une température T =37°C (température du corps humain) dans deux milieux différents :

- l'eau distillée (pH= 7,0).

- l'eau distillée additionnée au PBS (1N et à pH = 7,4) comparable au milieu physiologique.

Les échantillons soumis au test ont des formes rectangulaires de 30 mm de longueur, de 20 mm de largeur et de 0,1mm de d'épaisseur.

La quantité du liquide absorbé à l'équilibre G (%) est calculée par la relation suivante :

$$G(\%) = \frac{(m_m - m_s)}{m_s} x100 \quad \textbf{[19]}$$

Avec m_m : la masse du film gonflé à t

m_s : la masse du film sec à t = 0

Chaque essai de gonflement est répété trois fois. Puis on calcule la moyenne et ça va nous permettra de tracer les courbes G (%)-temps (h)

III-2-3.Détermination du nombre de moles des ε-amino groupes et évaluation du taux de réticulation par le TNBS

L'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) a été utilisé pour déterminer le nombre de groupements amino primaires dans les protéines, les peptides et les acides aminés par la formation d'un UV chromophore avec les résidus de la lysine et de l'hydroxylysine **[55-59].**

La réaction est représentée comme suit : **(fig. III.2)**

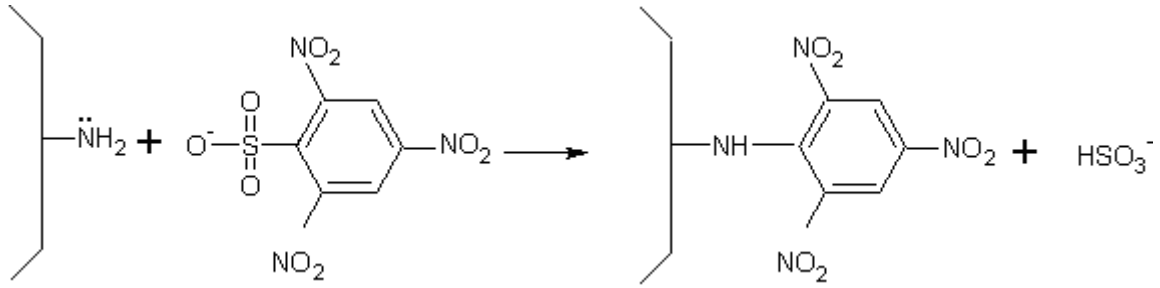


Figure III.2: réaction de l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique avec les groupements amino-protéines en milieu alcalin [57]

L'équation suivante permet de déterminer le nombre de moles de groupements ε-amino par gramme de gélatine:

$$\frac{\text{Nombre de moles de groupes amino}}{\text{Gramme de gélatine}} = \frac{2(\text{Absorbance})(0.02\ \text{litres})}{(1.46\times10^{4}\ \text{litre/mole.cm})(b)(x)} \qquad \textbf{[52]}$$

Où :

1,46 x 10^4 litres / moles.cm : l'absorptivité molaire du TNP-Lys(trinitrophényllysine)

(b) : l'épaisseur de la cuve de mesure en cm

(x) : la masse d'échantillon en gramme

Le degré de réticulation est directement calculé à partir de l'équation ci-dessous : **[39]**

$$\text{Degré de réticulation}(\%) = \frac{[1 - \text{absorbance du film réticulé}]}{\text{absorbance du film non réticulé}} \times 100(\%) \qquad \textbf{[60]}$$

Pour la réalisation de ce test, on mélange 11mg du film avec 1ml de $NaHCO_3$ (4% dans l'eau) et 1 ml de TNBS (0,5%). Le mélange est chauffé à 40°C pendant 4 heures.

Ensuite, 3ml d'HCl (6N) sont additionnés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 60°C pendant 2 heures. Afin de solubiliser et de dissoudre totalement le film, 5ml d'eau sont ajoutés. Une extraction est faite par 5 ml d'éther éthylique pour éliminer l'excès de TNBS restant ainsi que les groupes α-aminés de trinitrobenzène qui n'ont pas réagi.

5ml de la phase aqueuse sont prélevés du mélange et chauffés pendant 15min dans un bain-marie afin d'évaporer l'éther résiduel. Puis 15 ml d'eau ont été additionnés à la phase aqueuse **[58,59].**

L'absorbance est mesurée à 346 nm. **(voir annexe des spectres UV)**

Ce test a été fait sur tous les films préparés à différentes concentrations de glutaraldéhyde.

L'appareil utilisé est de type UNICAM UV 300

III-2-4. Analyse thermique à balayage différentiel (D.S.C.)

La calorimétrie à balayage différentiel est une technique utilisée pour étudier les différentes transitions thermiques des polymères lorsqu'ils sont chauffés **[61].** Telles que la température de transition vitreuse, la température de cristallisation, la température de fusion **(fig. III.3).**

Pour la mise en œuvre de cette technique, l'échantillon est placé dans un creuset hermétiquement clos. Le creuset de mesure ainsi que celui de la référence sont placés dans le four d'un calorimètre. L'appareil est conçu de telle façon que les deux creusets restent toujours à la même température.

Au cours d'une montée linéaire de la température, identique pour les deux creusets, la différence des quantités de chaleur qui leur sont fournies est enregistrée. Lorsque la gélatine fonde, il est nécessaire d'apporter plus de calories au creuset de mesure et un pic d'absorption de chaleur apparaît sur la courbe.

Le point où la température s'écarte de la ligne de base marque le début des transitions thermiques et le point où elle rejoint la ligne de base, la fin de cette opération (**fig. III.3).** La surface du pic au dessous de la ligne de base est fonction de la quantité de structure native contenue dans la gélatine. Le degré de structuration peut être déterminé en sachant que la dénaturation de 1mg met en jeu une quantité de chaleur égale à $4,8x10^{-2}$ Joules **[33].**

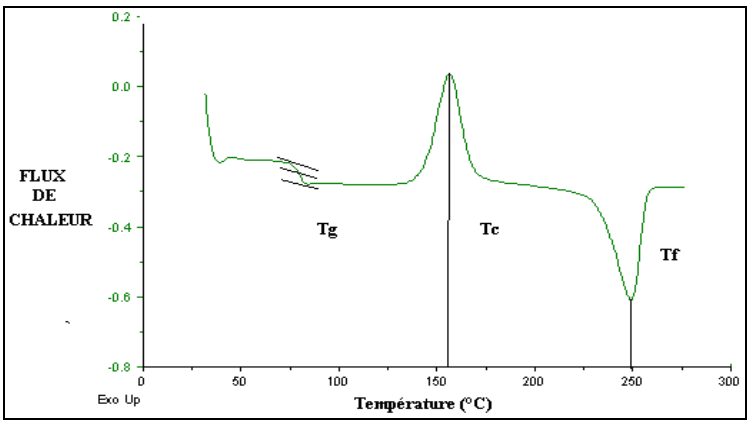


Figure III.3 : thermogramme typique (D.S.C.) de la gélatine [61]

L'appareil utilisé est de type SETARAM D.S.C.92

III-2-5. Analyse par diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X est la méthode la plus utilisée pour étudier les polymères semi-cristallins. Elle permet de déterminer quelques paramètres tels que les dimensions des mailles cristallines, la conformation cristalline de la chaîne, le degré de cristallinité et le degré d'orientation des chaînes.

Les chaînes peptidiques de gélatine ont une forme hélicoïdale et leurs axes s'enroulent en une super-hélice droite autour d'un axe commun. Lorsque une quantité de cette gélatine solide est placée au centre d'un goniomètre dans un faisceau de rayons X, l'intensité du rayonnement diffracté est enregistrée grâce à un compteur tournant le long du goniomètre **[33].** Les diffractogrammes sont donnés en **annexe 5**.

Le taux de cristallinité des différents films est calculé de la manière suivante :

$$X_c(\%) = \frac{M_t - M_A}{M_t} \times 100 = \frac{M_c}{M_t} \times 100 \qquad \textbf{[53]}$$

Où

M_A : masse de la phase amorphe

Mc : masse de la phase cristalline

Mt : masse totale

Xc : taux de cristallinité

L'appareil utilisé est de type Expert Prof Paranalytical DRX : diffractomètre des poudres

Chapitre IV
Résultats et discussion

RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV-1. Films secs avant réticulation

À T = 40°C, la solution aqueuse de gélatine est dans l'état sol, et par refroidissement, elle forme un gel physique thermoréversible. Elle perd sa structure de triple hélice et passe à la pelote : changement conformationnel **[11].**

Durant la gélification, les chaînes subissent une transition désordre-ordre et tendent à retrouver la structure en triple hélice la plus stable **[50,59].**

Nous devons aussi signaler qu'à des concentrations inférieures à 5% en gélatine, les films obtenus sont trop fins, fragiles et difficiles à manipuler.

La réaction de la réticulation en présence du glutaraldéhyde dans l'eau se déroule à température ambiante. Mais, après séchage, le film se déforme et présente un retrait considérable de plus de 15%.

Nous avons suivi la méthode de séchage entre deux plaques de verre et du papier absorbant stérile. Ce qui permet de réduire le retrait (de l'ordre de 3%).

IV-2. Films de gélatine réticulée par le glutaraldéhyde

Le glutaraldéhyde est l'agent réticulant le plus largement utilisé. Il possède une grande capacité de stabiliser les matrices à base de protéines dans un temps très court **[59].**

On remarque que la force d'adhésion des films aux supports hydrophiles décroît quand la densité (taux) de réticulation augmente: cette observation concorde avec celle émise par F. Falson-Rieg et *al.* **[62].**

Aussi, à l'oeil nu, on constate qu'il y a un changement de transparence des films; ils

deviennent de plus en plus opaque au fur et à mesure que la concentration en glutaraldéhyde augmente contrairement aux films natifs qui sont transparents **(fig. IV.1).** Ce phénomène confirme l'évolution d'une réaction entre les amino-groupes libres et le glutaraldéhyde **[47].**

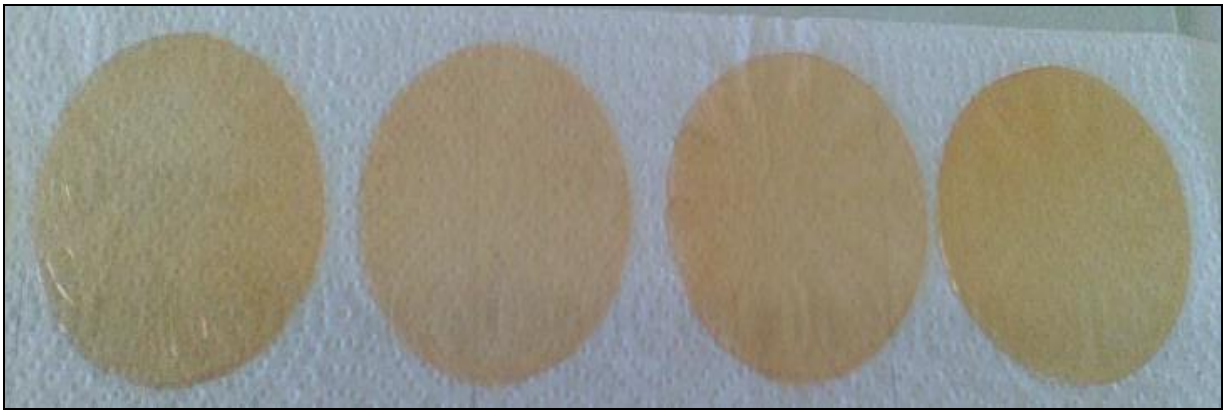


Figure IV.1: photo des films de gélatine réticulée

par le glutaraldéhyde (3%)

Le glutaraldéhyde réagit avec les résidus de la lysine par formation des liaisons covalentes **(Fig. IV.2) [50].** Cette réaction minimise le surenroulement des chaînes de la triple hélice de la gélatine. Ainsi, la structure de la molécule va être modifiée **[27].**

La réaction de réticulation en présence du glutaraldéhyde se déroule comme suit :

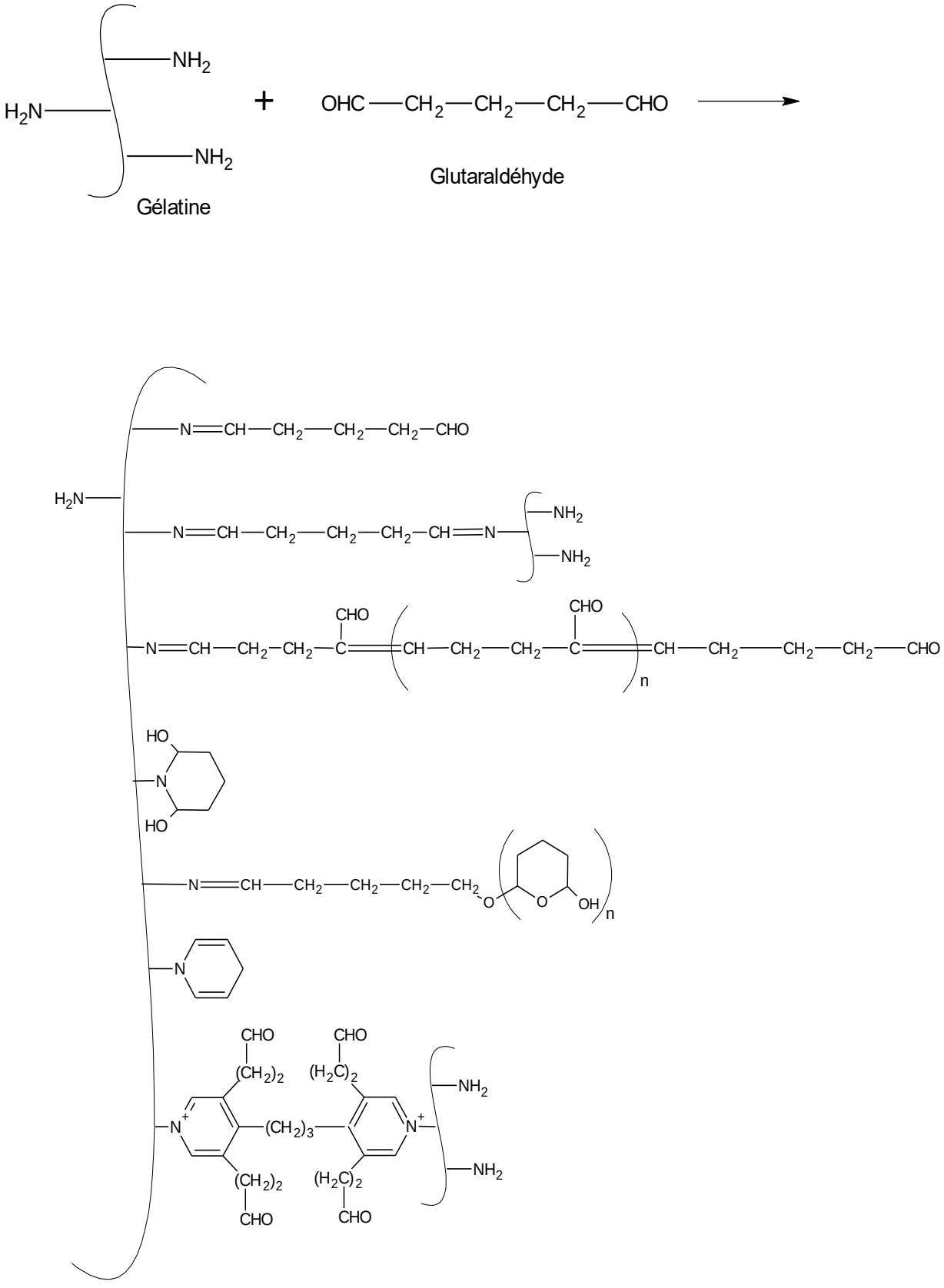
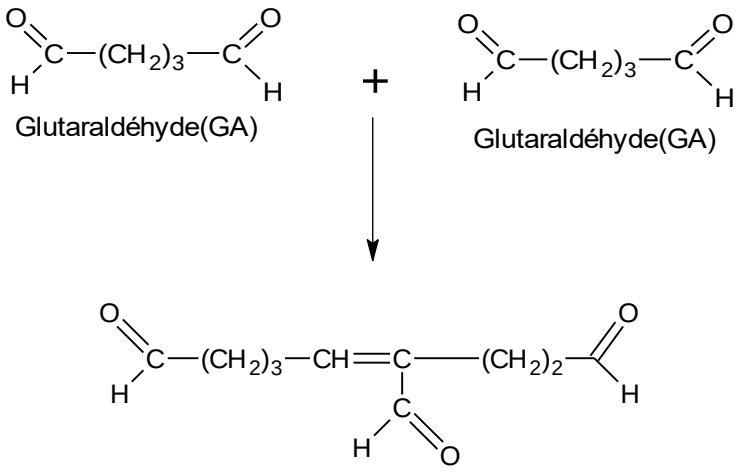


Figure IV.2:réaction de réticulation de la gélatine

par le glutaraldéhyde [16,63]

Par ailleurs, Sung *et al*. **[64]** proposent un mécanisme réactionnel qui met en jeu la condensation de deux ou plusieurs molécules de glutaraldéhyde. Ils suggèrent la réaction de la manière suivante :

-Il y a d'abord, la formation d'un composé crotonisé entre deux molécules de glutaraldéhyde comme le montre la réaction :



-Puis, le composé ainsi formé va se fixer sur les chaînes de la triple hélice de la gélatine par des liaisons imines et forme un réseau intermoléculaire plus rigide et plus serré **(Fig. IV.3) [64].**

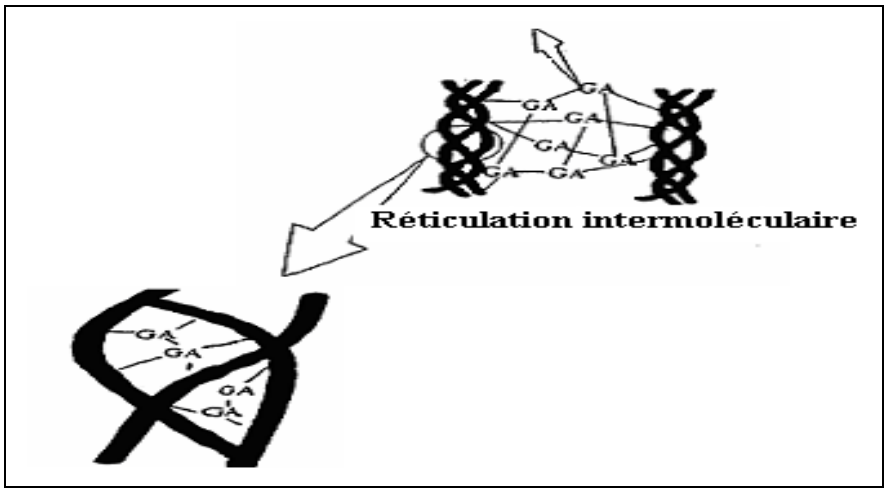


Figure IV.3 : schéma représentant la réticulation intermoléculaire entre les chaînes de gélatine et les molécules de glutaraldéhyde [64]

IV-3.Tests mécaniques de traction

La réticulation de la gélatine entraîne, en général, un changement de l'arrangement spatial des chaînes polymériques avec amélioration des propriétés mécaniques statiques de traction **[65].**

Les résultats de ce test sont illustrés par les différentes courbes de traction qui sont en **annexe 1**.

On remarque que :

La concentration du glutaraldéhyde influe fortement sur la contrainte, le module de Young et la déformation à la rupture.

Les valeurs de la déformation à la rupture dans le cas de la gélatine animale varient dans un intervalle restreint qui est d'environ 2% et cela dans la gamme de concentration de GA étudiée. Alors que pour la gélatine végétale, ce paramètre diminue avec la concentration en GA. Il passe de 3,8 % pour le film non réticulé à 3% pour le film réticulé à 3% de [GA] **(fig. IV.4).**

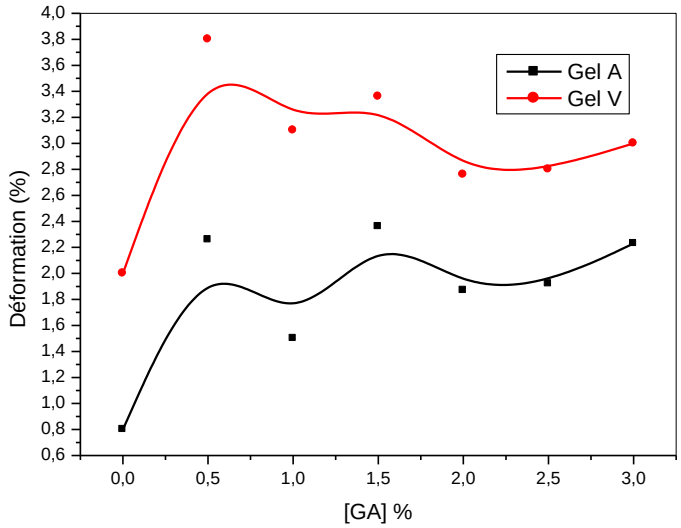


Figure IV.4 : **courbes montrant les valeurs de la déformation en fonction de la concentration pour les deux types de gélatine**

La contrainte à la rupture passe de 21 MPa pour le film de gélatine animale non réticulé à 82 MPa pour le film réticulé à 3%.

Ces résultats confirment les études antérieures menées par Bigi. **[50].**

Par ailleurs, les contraintes à la rupture de la gélatine végétale passent de 140 MPa pour le film réticulé à 0,5% à 102 MPa pour le film réticulé à 3% **(fig. IV.5)**

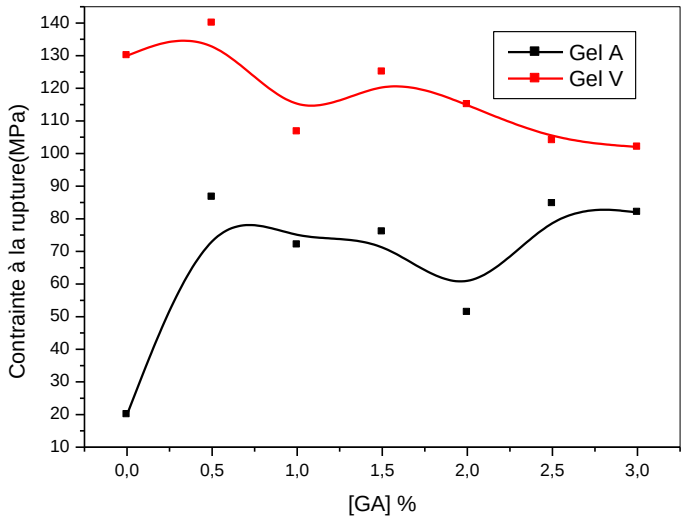


Figure IV.5 : courbes montrant les valeurs de la contrainte à la rupture en fonction de [GA] pour les deux types de gélatine

Pour le module de Young :

Ce paramètre varie dans un intervalle restreint (entre 50 et 60 MPa) pour la gélatine animale. Alors que pour la gélatine végétale : il diminue de 100 MPa pour le film non réticulé à 40 MPa pour le film réticulé à 3% **(fig. IV.6).**

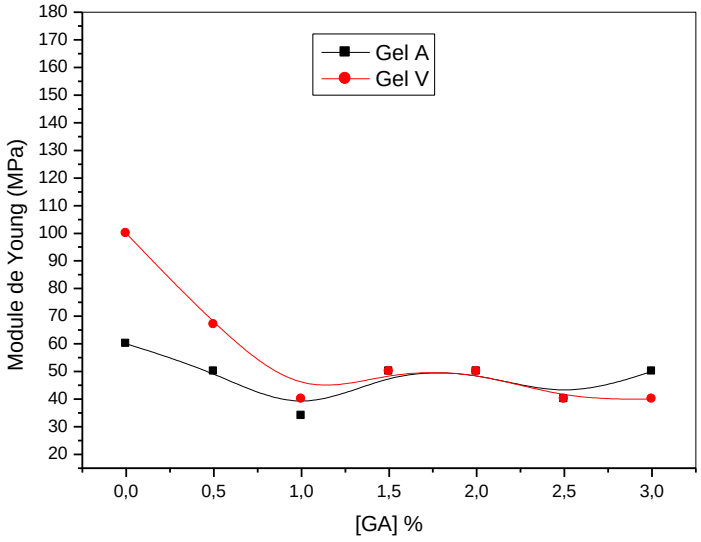


Figure IV.6 : courbes montrant les valeurs de module de Young en fonction de [GA] pour les deux types de gélatine

Nous concluons que les films de gélatine végétale réticulée à différentes concentrations de glutaraldéhyde exhibent des propriétés mécaniques meilleures par rapport aux films de gélatine animale et surtout pour les concentrations de 1,5 ; 2,0 ; 2,5 % en glutaraldéhyde.

On pense que ce résultat a une relation avec le degré de bloom, qui est plus élevé au niveau de la gélatine végétale (quantité en triple hélice plus élevée) **[66].**

IV-4.Gonflement

IV-4-1. Taux de gonflement

Les résultats sont donnés en annexe. **(voir annexe 2)**

Les courbes tracées en fonction du temps montrent l'existence de deux régions :

1-Une monté rapide sous forme d'une droite pendant un temps très court (de quelques minutes)

Ce phénomène est du principalement à : **[66]**

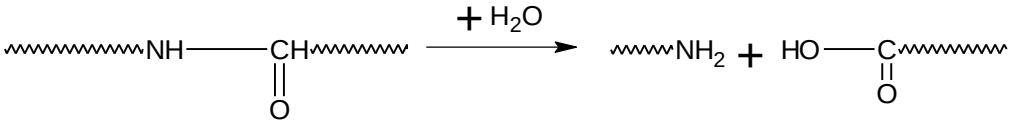
-L’hydratation de la gélatine qui a une affinité élevée pour l’eau et qui se traduit par la formation de liaisons hydrogène.

-L’état amorphe de la macromolécule, par conséquent, la pénétration du solvant au sein du volume libre se fait aisément.

-La différence de pression et de concentration à la surface du film.

2-Une stabilisation du gonflement sous forme d’un plateau. La vitesse de diffusion du solvant diminue puis s’annule. Cet état d’équilibre (d’entrée et de sortie de l’eau) peut durer des jours.

Enfin, au-delà de cette région, la mesure du gonflement devient difficile. Il est possible que des réactions d’hydrolyse de l’amide de la liaison peptidique surgissent entraînant ainsi une fragmentation des chaînes de la gélatine et passage des peptides ou des acides aminés formés dans le solvant comme suit :



[43]

L’étude en fonction de la concentration du glutaraldéhyde montre que plus la concentration de ce dernier augmente, plus que le taux de gonflement diminue. Cela indique que ce dernier est fortement lié au degré de réticulation. Nous pouvons déduire que le taux de réticulation trop important limite la capacité de gonflement du réseau polymérique par ce que la diffusion des chaînes va être bloquée par les liaisons covalentes déjà formées au cours de la réticulation **[62].**

Pour ce qui est du calcul du coefficient de diffusion et de la détermination de sa nature, ils n’ont pas pu être déterminés, car dès que l’échantillon est plongé dans le solvant, le

gonflement dépasse 100% de son poids. Cela est dû à une relaxation trop rapide des chaînes polymériques dans le solvant ; le gonflement sera contrôlé par la diffusion des molécules du solvant lui-même dans le réseau polymérique **[1].**

Concernant l'effet de l'ajout du PBS à l'eau à pH = 7,4 sur le gonflement, les Gmax correspondants sont supérieurs aux Gmax trouvés dans l'eau et cela quelque soit le film. Il est possible qu'il y ait un échange d'ions métalliques (tels que le Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}…provenant de la gélatine qui forment des polydentates) présents dans la gélatine par les ions Na^{+} provenant du PBS **[7].**

De même, les valeurs de Gmax obtenus pour la gélatine végétale sont supérieures aux valeurs de Gmax de la gélatine animale **(fig. IV.7-9).** Ce phénomène peut être expliquer par le fait de la rapidité de la saturation des sites polaires de la gélatine végétale par les groupements hydroxyles de l'eau (en formant des ponts hydrogènes) par rapport à la gélatine animale.

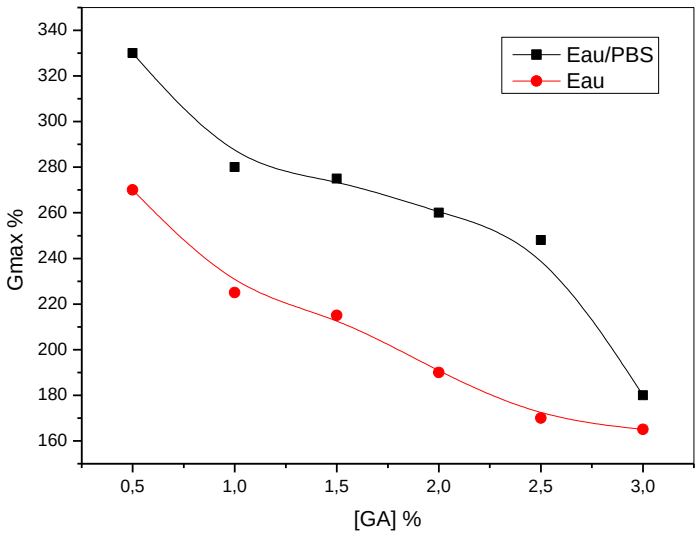


Figure IV.7 : courbes montrant les valeurs de Gmax pour la Gel A

en fonction de [GA]

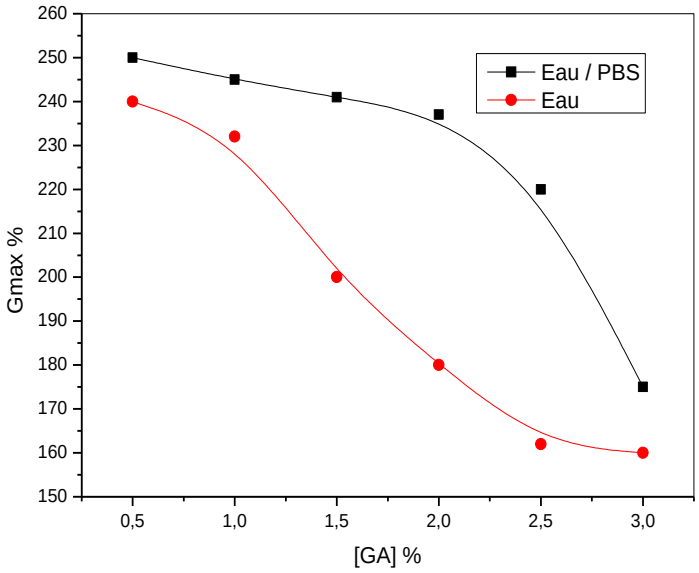


Figure IV.8 : courbes montrant les valeurs de Gmax pour la Gel V en fonction de [GA]

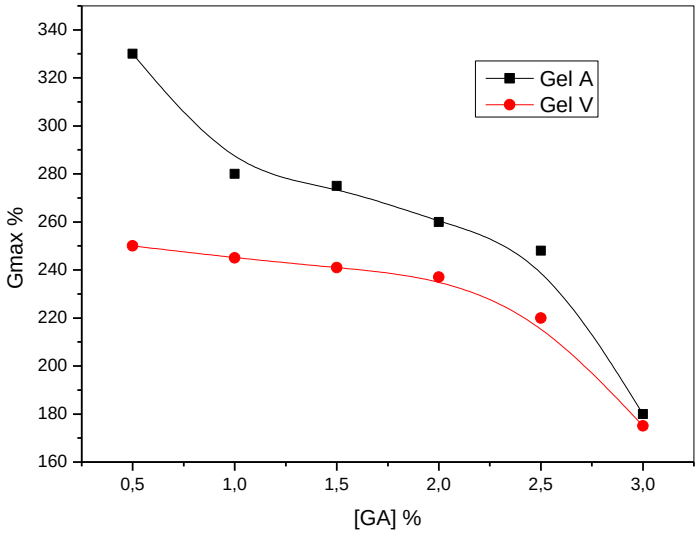


Figure IV.9 : Courbes de Gmax dans (eau/PBS) pour les deux types de gélatine

IV-5. Détermination du nombre de moles des ε-amino groupes et évaluation du taux de réticulation par le TNBS

Cette méthode de dosage des protéines par le TNBS nous a permis de calculer le nombre de ε-amino groupes (mole/g de gélatine) et d'évaluer le taux de réticulation des différentes gélatines grâce à l'équation qui relie le degré de réticulation à l'absorbance et au N_1.

Il a été reporté selon Ofner *et al*.**[57]**, qu'en se servant de cette méthode de dosage, la gélatine peut contenir un nombre de moles de ε-amino groupes pouvant varier selon le type de gélatine utilisé. Par exemple, pour une gélatine de poids moléculaire 100 000g $mole^{-1}$, le nombre des ε-amino groupes est de 33.10^{-5} moles/g de gélatine. C'est l'équivalent de 33 moles d'ε-amino groupes provenant essentiellement de la lysine et de l'hydroxylysine **[57].**

Les valeurs du nombre de moles des ε-amino groupes ainsi que celles des degrés de réticulation des différents films sont donnés dans les **tab. IV.1,2** et **fig. IV.10,11**.

Tableau IV.1 : tableau représentant le nombre de moles des ε-amino groupes et les degrés de réticulation des différents films de Gel A en fonction de [GA]

[GA] %	N_1 (mole/gramme de gélatine) x 10^5	N_2 (mole/gramme de gélatine) x 10^5	Degré de réticulation (%)
0	29,68	00,00	00,00
0,5	23,68	06,00	37,15
1	17,68	12,00	40,43
1,5	15,24	14,44	48,65
2	12,80	16,88	56,88
2,5	10,58	19,10	64,43
3	08,03	21,65	67,05

Sachant que: $\mathbf{N_2 = 29,68 - N_1}$

Tableau IV.2 : tableau représentant le nombre de moles des ε-amino groupes et les Degrés de réticulation des différents films de Gel V en fonction de [GA]

[GA] %	N_1 (mole/gramme de gélatine) x 10^5	N_2 (mole/gramme de gélatine) x 10^5	Degré de réticulation (%)
0	39,50	00,00	00,00
0,5	23,19	16,31	41,29
1	19,97	19,53	49,43
1,5	15,96	23,54	59,58
2	11,20	28,30	71,62
2,5	18,98	20,52	48,08
3	20,15	19,35	35,29

Avec: $N_2 = 39,50 - N_1$

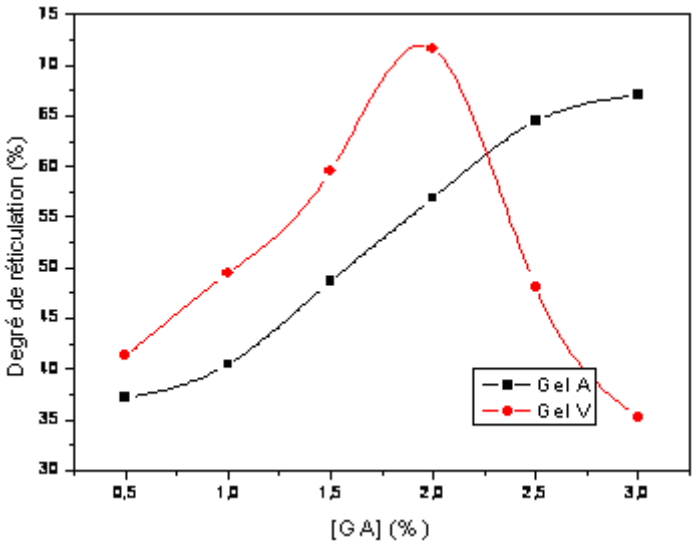


Figure IV.10 : courbes représentant la variation du degré de réticulation en fonction de [GA] pour les deux types de gélatine

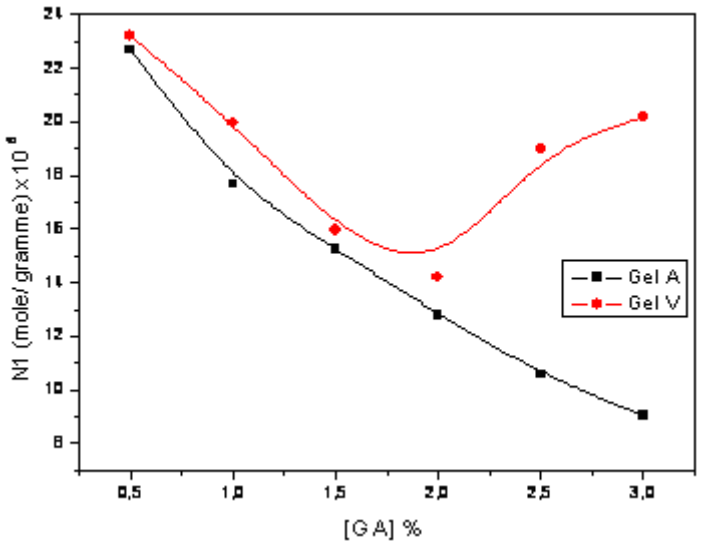


Figure IV.11 : courbes représentant la variation du nombre de moles de ε-amino groupes qui ont réagi avec le TNBS (N_1) en fonction de [GA]

Le nombre des ε-amino groupes diminue avec l'augmentation de la concentration du glutaraldéhyde pour la gélatine animale **(tab. IV.1**). Par conséquent, le taux de réticulation augmente jusqu'à 67 % pour [GA] égale à 3%.

Alors que pour la gélatine végétale, le taux de réticulation atteint un maximum à 71,62% pour une concentration de 2% en glutaraldéhyde **(tab. IV.2).** Mais au delà de cette concentration, nous avons une chute du taux de réticulation avec une augmentation du nombre N_1.

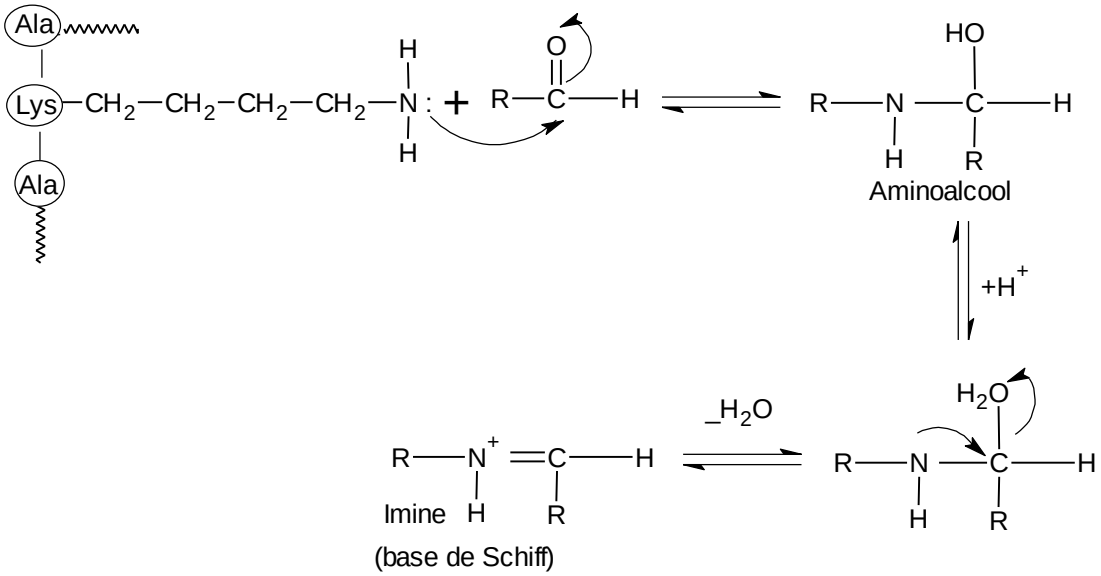
Par ailleurs, nous avons remarqué :

Pour la gélatine animale, le taux de réticulation augmente de 37,15 à 64,43% pour une concentration allant de 0,5% à 2,5% en GA, alors que pour la gélatine végétale, il passe de 41,29% à 71,62% pour une concentration allant de 0,5 à 2% en glutaraldéhyde.

La diminution des ε-amino groupes peut être expliquée à l'échelle moléculaire comme suit :

Les amines primaires et secondaires qui composent la gélatine, en raison de leur caractère nucléophile, peuvent s'additionner sur la double liaison C=O des aldéhydes pour donner un

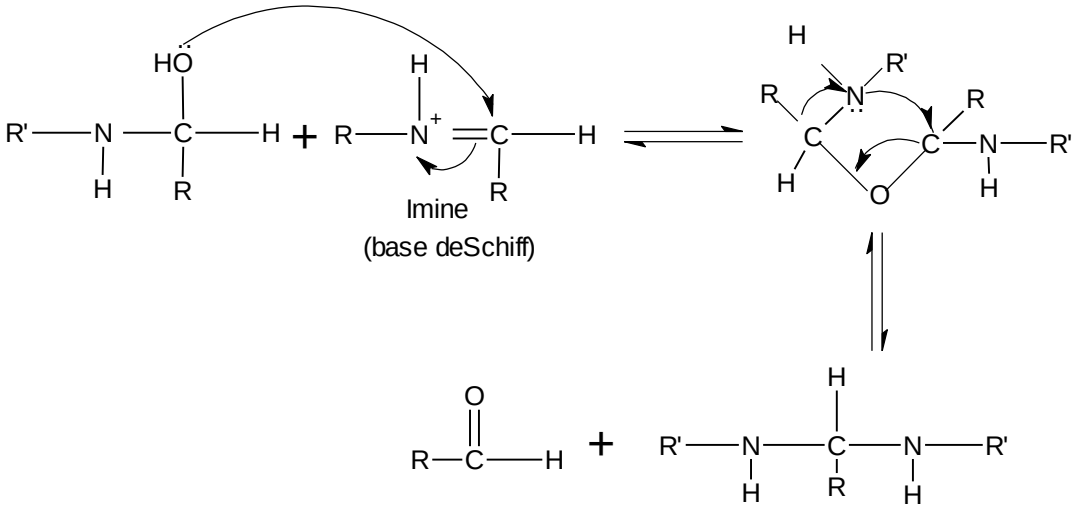
aminoalcool. Si l'amine est primaire, ce qui assurera la présence d'un atome d'hydrogène sur l'azote de l'aminoalcool. Celui-ci se déshydrate spontanément comme le représente la réaction suivante pour former une imine qu'on appelle « base de Schiff » **[43].**

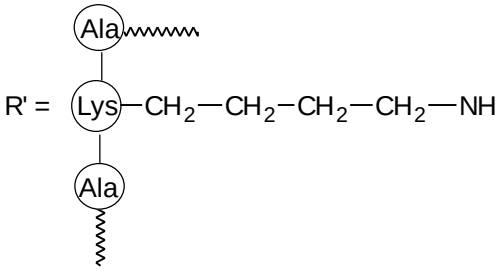


R = alkyle

Cette base de Schiff formée va à son tour réagir avec un autre $-NH_2$ d'une autre molécule de gélatine pour donner de la gélatine réticulée **[43].**

Le mécanisme réactionnel est le suivant : **[67]**





IV-6.Analyse thermique enthalpique (D.S.C.)

Les différentes transformations thermiques au sein du matériau analysé par D.S.C. (la gélatine) causent les phénomènes suivants **[68]** :

- L'abaissement des jonctions entre les chaînes adjacentes ;
- l'augmentation des interactions entre les macromolécules et le solvant ;
- l'interruption des zones cristallines ;
- l'expansion du volume libre du système complet et donc l'augmentation de la mobilité des molécules.

La transition vitreuse selon Fakirov *et al.* **[54]** est caractérisée par deux pics endothermiques dus à deux transitions sol-gel de la gélatine :

L'un représente la transition (Tg) attribuée à la plastification par l'eau associée aux protéines par les liaisons hydrogène qui se détruisent endothermiquement. Sachant que la valeur de cette transition diminue au fur et à mesure que la quantité d'eau intermoléculaire augmente. C'est une contraction thermique qui se manifeste. Et elle est due à une contraction physique causée par l'évaporation de l'eau.

L'autre (Tm) est une transition conformationnelle. Elle représente la transition de la structure hélicoïdale en triple hélice. Elle apparaît dans la gélatine solide sèche au delà de 250°C **[69].**

Les thermogrammes obtenus des différents films de gélatine soit végétale ou animale exhibent l'apparition d'une transition endothermique de Tg. (**voir thermogrammes en annexe 4**).

Nos resultats trouvés sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature **[65, 69].**

A T = Tg, la gélatine passe d'un liquide visco-élastique à un solide semi cristallin et aucune chaleur latente n'est désorbée ou absorbée par la gélatine **[69].**

On constate aussi que la réticulation a une grande influence sur l'augmentation de la stabilité thermique des films ; au fur et mesure que la concentration de l'agent réticulant augmente, la stabilité thermique augmente. Cela est justifié par la diminution des valeurs trouvées de Tg (**tab. IV.3) [65].**

Dans l'intervalle étudié de température, il a été observé que le domaine de la stabilité thermique est de: 100°C à 110°C pour la gélatine animale et de 80 °C à 100 °C pour la gélatine végétale. Cela veut dire selon Osada **[7]** qu'aucune dégradation du produit dans cette zone de température n'a pu être détectée.

Tableau IV.3 : tableau représentant les valeurs de Tg pour les différents films de gélatine réticulée par le glutaraldéhyde

[GA] %	**0** (poudre)	**1,5**	**2**	**2,5**
Tg (°C) pour Gel A	56,85	54,18	52,26	47,03
Tg (°C) pour Gel V	52,30	51,19	49,11	43,78

La D.S.C. fait donc ressortir que la gélatine végétale de bloom supérieur est plus stable que la gélatine animale. Cette différence est due essentiellement au taux d'humidité qui est plus élevé au niveau de la gélatine végétale que dans de la gélatine animale. Et aussi aux taux d'hydroxyproline et de proline qui sont plus élevés au niveau de la gélatine végétale ; l'hydroxyproline et la proline jouent un rôle essentiel dans la stabilisation de la structure hélicoïdale grâce à leur hétérocycle **[33].**

IV-7.Résultats des rayons X

Parmi les effets de l'augmentation de la concentration de l'agent réticulant, on a l'expansion des mailles unitaires qui sont des unités représentatives du réseau cristallin et donc l'augmentation des distances interréticulaires **[70].** Cela se traduit par la croissance de l'intensité des pics au niveau des diffractogrammes des RX**.**

Tous les diffractogrammes comportent essentiellement un pic large à environ 20° et deux pics moins définis dus à la structure hélicoïdale de la protéine.

Le premier pic P1 à environ 7° provient du réseau des triples hélices et correspond à une distance régulière de 1,16 nm qui est susceptible de varier en fonction de l'hydratation de

la gélatine.

Le deuxième pic P2 à environ 44°, il est engendré par la distance régulière (0,295 nm) séparant deux résidus consécutifs d'acides aminés **[33] (voir annexe des spectres des rayons-X).**

On a trouvé que le taux de cristallinité atteint 31,15% pour une concentration de 1,5% en glutaraldéhyde pour les films de gélatine animale, et dépasse 40% pour la même concentration en glutaraldéhyde pour la gélatine végétale **(tab. IV.4,5).**

Tableau IV.4 : tableau montrant les taux de cristallinité des films de Gel A

calculés à partir des difractogrammes de DRX

[GA] %	1,5	2,0	2,5
Xc %	31,15	32,90	34,67

Tableau IV.5 : tableau donnant les taux de cristallinité des films de Gel V

calculés à partir des difractogrammes de DRX

[GA] %	1,5	2,0	2,5
Xc %	40,01	43,50	44,16

CONCLUSION

Grâce à ses propriétés technologiques et biologiques, la gélatine est considérée comme un excellent excipient pharmaceutique.

Des tentatives d'utilisation des films de gélatine à l'état sec (sans modifiants) donnent des films friables, non résistants à la chaleur et de mauvaises propriétés mécaniques.

Par contre l'addition du glutaraldéhyde comme agent réticulant conduit à un matériau plus résistant et plus rigide.

● Pour notre étude, nous nous sommes intéressés à la préparation des films de gélatine qui sont obtenus par hydrosolubilisation de grains à 5% en masse et à température inférieure à 40°C. Le séchage s'effectue à l'air libre sur des supports hydrophobes en polystyrène ; cependant, il conduit à la formation de pellicules trop fragiles.

Les concentrations de GA choisis pour notre étude sont : 0,5% ; 1,0% ; 1,5% ; 2,0% ; 2,5% et 3,0%.

Tous les films obtenus après séchage se déforment et se contractent de plus de 10%.

● La gélatine végétale montre de meilleures caractéristiques mécaniques à la traction compte tenu de son bloom plus élevé (masse moléculaire plus grande et cristallinité plus élevée).

L'allure de la courbe est celle d'un matériau plastique à comportement viscoélastique. Ce comportement est aussi observé pour la gélatine animale.

● Les tests de gonflement montrent que plus la concentration de GA augmente, plus le taux de gonflement diminue considérablement. Ce qui indique que le réseau réticulé s'est formé et que la réticulation est directement liée à Gmax.

L'ajout des sels de PBS à l'eau, milieu comparable au milieu physiologique, entraîne une augmentation des valeurs de Gmax et c'est pour les deux types de gélatine.

Par ailleurs, les films de gélatine végétale montrent un taux de gonflement plus élevé parrapport à celui obtenu pour les films de la gélatine animale et c'est dans les deux milieux.

● La détermination du nombre des ε-amino groupes présents dans la gélatine se fait selon la méthode de dosage par le TNBS, cette méthode nous permet aussi de calculer le taux de réticulation de la gélatine.

Les résultats obtenus montrent qu'il existe 39 ε-amino groupes dans la gélatine végétale et 29 ε-amino groupes dans la gélatine animale ; ce nombre diminue au fur et à mesure que la concentration du glutaraldéhyde augmente. Par contre le taux de réticulation augmente et atteint une valeur de 67 % pour les films de gélatine animale et atteint une valeur supérieure à 71 % pour les films de gélatine végétale.

● L’analyse thermique enthalpique (D.S.C.) montre que la gélatine est un polymère qui passe de son état visco-élastique à l’état semi cristallin au fur et à mesure que la température augmente.

On a déduit que l’augmentation de la concentration du GA provoque la diminution des valeurs de Tg.

Et on a constaté que :

Les valeurs de Tg de la gélatine végétale sont inférieures aux valeurs de Tg de la gélatine animale et que probablement le taux d’humidité des films de la gélatine végétale est plus élevé.

● Pour le dernier test qui est l’analyse par DRX, il confirme les résultats trouvés précédemment par les autres tests et surtout il prouve la présence de la structure semi-cristalline pour les deux types de gélatine.

Afin de lever toute ambiguïté et d’apporter et de répondre aux questions qui restent poser ; il serait nécessaire de :

1- Mener une étude comparative de plusieurs types de gélatine (y compris la gélatine extraite des poissons).

2- Etendre l’intervalle de concentration en glutaraldéhyde (bien que cette concentration doive rester trop faible à cause de la toxicité).

3- Substituer le glutaraldéhyde (dialdéhyde) par un monoaldéhyde.

4- Déterminer la composition chimique exacte des différentes gélatines.

5- Evaluer une étude biologique du point de vue activité, toxicité, biodégradabilité, biocompatibilité… pour mieux voir la faisabilité des films ainsi synthétisés et voir s'ils nécessitent d'autres traitements d'amélioration.

6- Et enfin, faire appel à d'autres méthodes de dosage et de caractérisation exemple : par RMN ^{1}H et ^{13}C et par UV Visible à différents pH afin de suivre l'évolution et la cinétique de la réaction de réticulation entre les différents constituants. Et aussi pour une éventuelle élucidation de la structure du réseau formé.

REFERENCES

[1] S. Chaibi; ' Préparation et Caractérisation de Films à Base de Gélatine Réticulés par du Glutaraldéhyde et/ou Modifiés par du Glycérol, PVA', Thèse de Magister : Génie des polymères, Université de Sétif, PP.65- 69 (2003)

[2] S. Chinoune; 'Etude et Caractérisation de la Colle de Gélatine-Résorcine-Glutaraldéhyde préparée sous forme de films sec', Mémoire de Magister : Génie des polymères, Université de Sétif, PP.29- 55 (2005)

[3] W. Merouani; ' Préparation de Films Analogues aux Hypocycloïdes Biologiques à base de Gélatine/Carboxyméthylcellulose de sodium et Etude de leur Réticulation Chimique par le Glutaraldéhyde', Mémoire de Magister : Génie des polymères, Université de Sétif, PP.36- 54 (2006)

[4] M. Djabourov ; 'la Gélification Thermoréversible. Exemple : la Gélatine ', Revue Générale de Thermique, PP. 306, 307,309 (1987)

[5] I. Galaev and B. Mattiasson; 'Smart Polymers Applications in Biotechnology and Biomedicin', Chap.8, 2nd ed. (2007)

[6] P.H. Herman; 'Colloid Science', éd.H. R. Kruyt, New York,. PP. 483-494 (1949)

[7] Y. Osada; 'Gel Handbook', éd. Academic Press, New York, Vol N°1, PP. 76-194 (1997)

[8] M. Djabourov; ' Les Gels de Biopolmères ', Image de la Recherche, PP. 213-214 (1993)

[9] M. Boissiere; ' Elaboration et Caractérisation de Microsphères hybrides Kappacarraghénane/ Silice', Thèse de doctorat : Université de Montpellier, PP. 12-66 (2004)

[10] G.C.Fadda, D.Layrez and J. Pelta; 'The Sol-Gel Transition probed by the dynamics studies of Latex Particules Studied by QELS', Physica A, Vol.304, PP.103-110 (2002)

[11] A.G. Ward; 'The Science and Technology of Gelatine', Academic press, London PP. 99, 159-207 (1977)

[12] A. Bot, R. H. Wientjes and H. Klaas de Haas; 'The Transition Zone of Gelatin Gels as Measured by High-Frequency Rheology', The Imaging Science Journal 45, PP. 191-196 (1997)

[13] W. Krammer; 'Gelatin in EPST', éd.Harland H. Young Swift and company, 1st ed. Vol.7. PP. 488-511 (1999)

[14] M. M. Welz and C.M. Ofner III; 'Examination of Self-Crosslinked Gelatin as a Hydrogel for Controlled Release', Journal of pharmaceutical sciences, Vol. 81, N1, PP.753-833, January (1992)

[15] J. Chen, S. Jo and K. Park; 'Degradable Hydrogels', Chap.11, Purduce, University, School of Pharmacy, West Lafayette, IN 47907,USA, PP. 506-511 (1987)

[16] Y. Osada and K. Kajiurara; 'Gels Handbook', éd. Academic Press, New York, Vol.N°2, PP. 78-100 (2001)

[17] S. W. Shalaby, Y. Ikada, R. Langer and J. Wiliams; 'Polymers of Biological and Biomedical Significance', éd. Library of Congresse Cataloguing in Publication DATA, Wachington, DC, PP.16 (1992)

[18] R. Schrieber and H. Gareis; 'Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice', éd. Wiley-VCH Verlag &Co. KCaA, USA, PP.50-116 (2006)

[19] R.A. de Carvalho and C.R.F Grosso; 'Properties of Chemically Modified Gelatine Films', J. Brazilian journal of chemical engineering, Sao Paulo, N°1, PP1322-1331, Jan /mar (2008)

[20] G. Champetier et L. Monnerie; ' La Chimie Macromoléculaire', éd .Germai, Paris VI, PP. 11, 15, 29, 174 (1969)

[21] E. Schacht; '*In vitro* Release Characteristics of Bioactive Molecules from Dextrandialdehyde-Crosslinked Gelatin-Hydrogels Films', J. biomaterials, N°19, PP.99-107 (1997)

[22] O. Guven.; 'Super Water reteiner Hydrogels: Crosslinked Acrylamide/ Succinic Acid-Copolymers', J. polymers, N°8, PP.631-636 (1997)

[23] A. Le Hir ; 'Pharmacie Galénique- Bonnes Pratiques de Fabrication des Médicaments', 8ème éd.. éd. Masson, Paris, PP.76- 78 (2001)

[24] T. R. Keenan; 'La Macromolécule de Gélatine', éd Ellipse, Paris, Chap. 16, PP. 92-111 (1998)

[25] 'Gélatin in Encyclopedia of Polymer Science and Engineering', Vol. 3,.éd. Willey and sons, PP. 488 (1987)

[26] R. E. Norland; 'Coatings Technology Handbook', Vol. 65(Fish Gelatin and Fish Glue), Norland Products, Inc 3rd ed. PP. 345-421 (2006)

[27] F. H. Silver and A. k. Garg; 'Collagen: Characterization, Processing and Medical Applications', vol.17, PP.1-2 (2006)

[28] M. Djabourov, N. Bonnet and H. Kaplan; '3D analysis of Gelatine Gel Networks from Transmission Electron Microscopy Imaging', Journal of Phys II France 3, PP.611-624 (1993)

[29] W. De Carvalho et M. Djabourov; 'Prise en Gel des Solutions de Gélatine sous Cisaillement', Revue Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes, PP. 2(1995)

[30] J. Surh and E. A. Decker; 'Properties and Stability of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Fish Gelatine', J. of Food Hydrocolloids 20, PP.596-606 (2006)

[31] J. Olive, F. Mori and Y. Toda; 'Influence of the Molecular-Weight Distribution of Gelatin on Emulsion Stability", J.of Colloid and Interface Science 243, PP.476-482 (2001)

[32] C. Chène; 'La Gélatine', J. de l'Adrianor, Agro-jonction N° 24, PP. 752-788Septembre/Octobre (2000)

[33] M. C. Martini and M. Seiller; 'Actifs et Additifs en Cosmétologie', éd. Tec et Doc, 3ème éd, PP. 279-958 (2000)

[34] C. P. Chang and T.K. Leung; 'Release Properties on Gelatine-Gum Arabic Microcapsules Containing Camphor Oil with added Polystyrene', Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol.50PP.136-140, (2006)

[35] Y. S. Choi and S. R. Hong; 'Study on Gelatin-Containing Artificial Skin: I Prepaparion and Characteristics of Novel Gelatine-Alginate Sponge', J. of Biomaterials Vol.20, PP.409-417 (1999)

[36] R. G. Buice, T. B. Gold and R. A. Lodder; 'Determination of Moisture in intact Gelatin Capsules by Near-Infrared Spectrophotometry', J. of Pharmaceutical Research, Vol. 12, N1PP. 333-345 (1995)

[37] C. M. Ofner III and Y.E. Zhang; 'Crosslinking Studies in Gelatin Capsules Treated with Formaldehyde and in Capsules Exposed to Elevated Temperature and Humidity', J. of Pharmaceutical Sciences, vol. 90, N1, January (2001)

[38] R. G. Hung, J. B. Schawrtz and C. M. Ofner III; 'Microencapsulation of Chlorpheniramine Maleate-Resin Particles with Crosslinked Chitosan for Sustained Release', Pharmaceutic Development and Technology, , Vol.4, N1, PP. 107-115 (1999)

[39] E. Schacht, J. P. Draye and B. Delaey; 'Medicaments Containing Gelatine Crosslinked with Oxidized Polysaccharides', United States Patent, N.6, 132,759.October (2000)

[40] Ya-I Huang and Y.C. Chih; 'Microencapsulation of Extract Containing Shikonin Using Gelatine-Acacia Coacervation Method: A Formaldehyde-Free Approach', Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 58. PP.290-297 (2007)

[41] F. Di. Cosmo; 'Drug Delivery via Therapeutic Hydrogels', United States Patent. N.6, 228, 393, B1. Mai 8 (2001)

[42] H.W.Sung, D.M. Huang and W.H.Chang; 'Evaluation of Gelatin Hydrogel Crosslinked With various Crosslinking Agents as Bioadhesives: *in vitro* Study', éd. John Wiley and Sons, Inc, PP. 520-530 (1999)

[43] P. Arnaud; 'Chimie Organique', éd. Duono, France, PP. 423 et 578 (2004)

[44] A. Raisonnier; 'Biochimie Métabolique et Régulations C1', Faculté de médecine Pierre et Marie Curie, Université de Paris IV, PP. 135 (2002 /2003)

[45] Y. Ikada;'Polymers of Biological and Biomedical Significance', A.C.S, Washington, PP.275, 285 (1996).

[46] H. W. Sung, H. F. Liang, C. T. Huang and H. Tu, 'Medical use of Aglycon Geniposidic acid', United States Patent Application Publication, N° 2006/0034885PP. 1-19 (2006)

[47] Y. Otani, Y. Tabata and Y. Ikada; 'Hemostatic Capacity of Rapidly Curable Glues from Gelatin, Poly (L-glutamic acid), and Carbodiimide', journal of biomaterials 19, 2091-2098 (1998)

[48] J. P. Delaye and A. Van de Voorde; '*In vitro* and *In vivo* Biocompatibility of Dextran Dialdehyde Cross-linked Gelatine Hydrogel Films', J.of Biomaterials 19, 1677-1687 (1998)

[49] J. Wu and S.C. Chiu; 'Effect of Phenolic Compounds on Gelatin Behaviour of Gelatine Gels', J. of polymer science, Part A: Polymer Chemistry, Vol 39, 224-231 (2001)

[50] A. Bigi; 'Mechanical and Thermal Properties of Gelatine Films at Different Degrees of Glutaraldéhyde Crosslinking', J. Biomaterials, PP. 1606-1610 (2000)

[51] T.H Mohammed; 'Covalent Crosslinking in heated Protein Systems', J. of Food science. N.2, PP 220-230 (2000)

[52] K.W. Song; 'Study on Gelatin Containing Artificial Skin', J. of Biomaterials, N.20. PP.409-417(1999)

[53] G. Champetier et L. Monnerie; 'Introduction à la Chimie Macromoléculaire', ed. Masson et Cie, France, PP. 269-311 (1979)

[54] T. Fushini; 'Gels Handbook ', The Fondamentals Academic Press, vol. 1, Santiago (2001)

[55] A. Bubnis; 'Chemical and Swelling Evaluations of Amino Group Crosslinking in Gelatin and Modified Gelatine Matrices', N.12, PP.1821-1827 (1996)

[56] S.C.Yaung; "Studies on Gelatin-Containing Artificial Skin: II. Preparation and Characterization of Cross-Linked Gelatin-Hyluronanate Sponge", J. of Biomedical Materials Research, Vol. 48. P 631-639 (1999)

[57] C.M.Ofner and W.A .Bubnis; 'The Determination of ε Amino Groups in Soluble and Poorly Soluble Proteinaceous Materials by a Spectrophotometric Method Using Trinitrobenzensulfonic acid', J.Analytical Biochemistry, Vol. 207.PP.129-133 (1992)

[58] D. V. Dubois ; 'Préparation de Peptides Antimicrobiens à partir de l'Hydrolyse Enzymatique de deux protéines : l'Hémoglobine Bovine et l'α -Lactalbumine Bovine', Thèse de doctorat, Université des Sciences Techniques de Lille, PP.49 (2006)

[59] A. Biji, G. Cojazzi, S. Panzavolta, K. Rubini and N. Roveri; 'Mechanical and Thermal Properties of Gelatine Films at Different Degrees of Glutaraldéhyde Crosslinking', Biomaterials .Vol.22. PP.763-768 (2001)

[60] C.M.Ofner III, W.A. Bubnis; 'Chemical and Swelling Evaluations of Amino Group Crosslinking in Gelatin Matrices', J. Pharm res., Vol.13, PP.1821-1827 (1996)

[61] P. Souchay et G. Pannetier; 'Chimie Physique : Thermodynamique Chimique', ed. Masson et Cie, PP. 538 (1981)

[62] F. Falson-Rieg, V. Faivre et F. Pirot; 'Nouvelles Formes Médicamenteuses', éd. Tec et Doc, Paris, PP. 13 (2004)

[63] S. Matsuda, H. Iwata, N. Se and Y. Ikada; 'Bioadhesion of Gelatine Films Crosslinked with Glutaraldehyde', John Willey and sons, Inc, J. of Biomed Mater Res. Vol. 45.PP. 21-27 (1999)

[64] H. W. Sung and M. C. Chen; 'Drug- Eluting Biodegradable Stent', United States Patent, N. 0,141,100,A1 Jun 21 (2007)

[65] A.Bigi, B. Bracci, G. Cojazzi, S. Panzavolta and N. Roveri; 'Drawn Gelatin films with improved Mechanical Properties', J.of Biomaterials. Vol 19. PP.2335-2340 (1998)

[66] A. Bigi, S. Panzavolta and K. Rubini; 'Relationship between Triple-Helix content and Mechanical Properties of Gelatine films', J. of Biomaterials Vol. 25, PP.5675-5680 (2004)

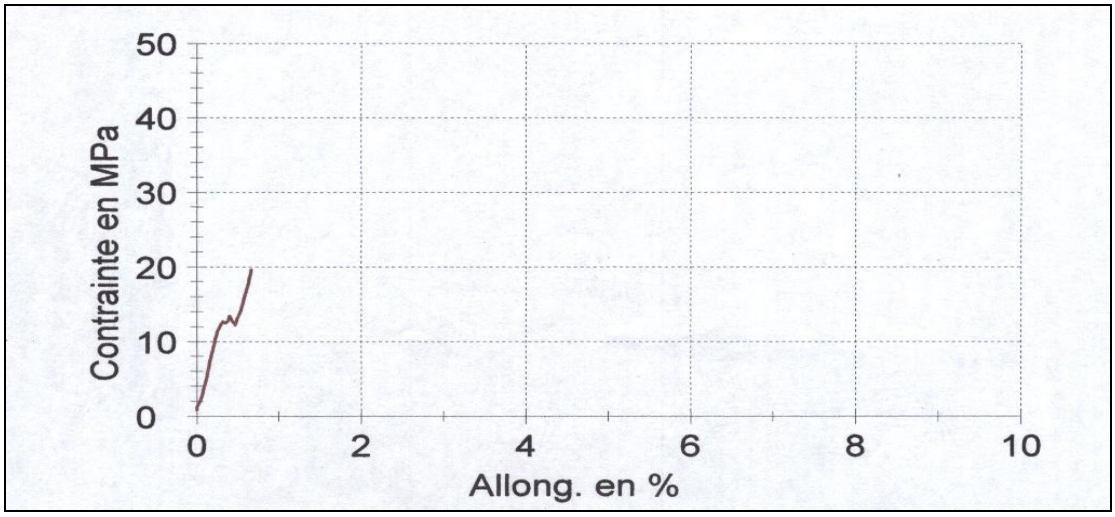
[67] G.A. Digenis; 'Cross-linking of Gelatin Capsules and its Relevance to Their *in vitro-in vivo* Performance', J. Pharmaceutical science, N°7, PP. 915-920 (1994)

[68] P.J.A. Sobral and A.M.Q.B. Habitante; 'Phase Transitions of Pigskin Gelatine', J.of Food Hydrocolloids, Vol. 15, PP.377-382 (2001)

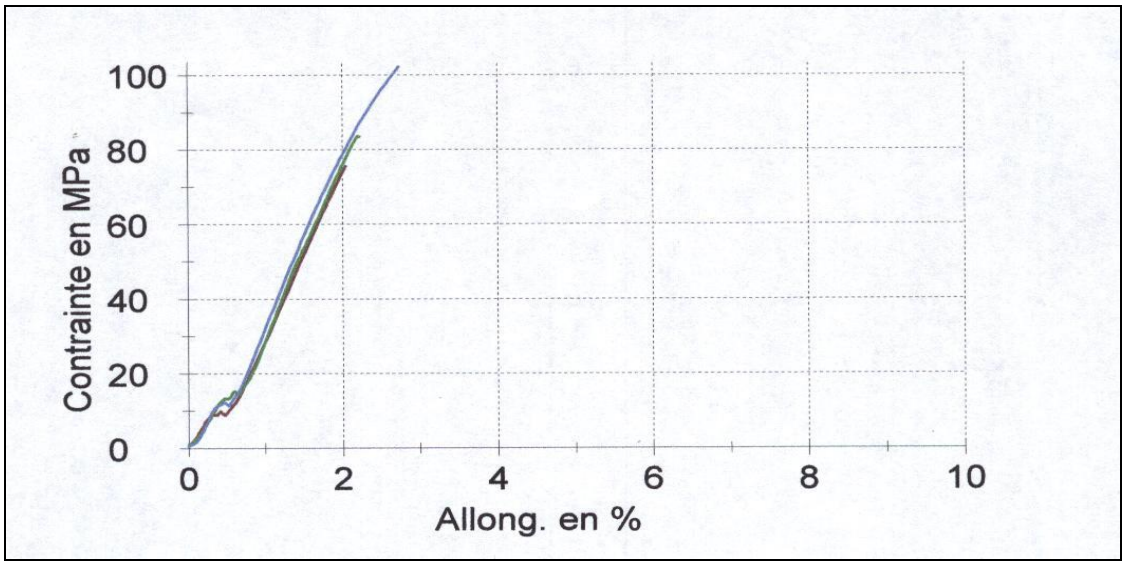
[69] S.Fakirov, Z.Sarac, T.Andar and B.Boz; 'Mechanical Properties and Transitions Temperatures of Cross -linked-oriented Gelatin', Colloid. Polym. Sci. Vol. 275. PP. 307- 314 (1997)

[70] P. Gergaud; 'Théorie et Principe de la Radiocristallographie', PANanalytical, Marseille, France. PP.91- 111 (2005)

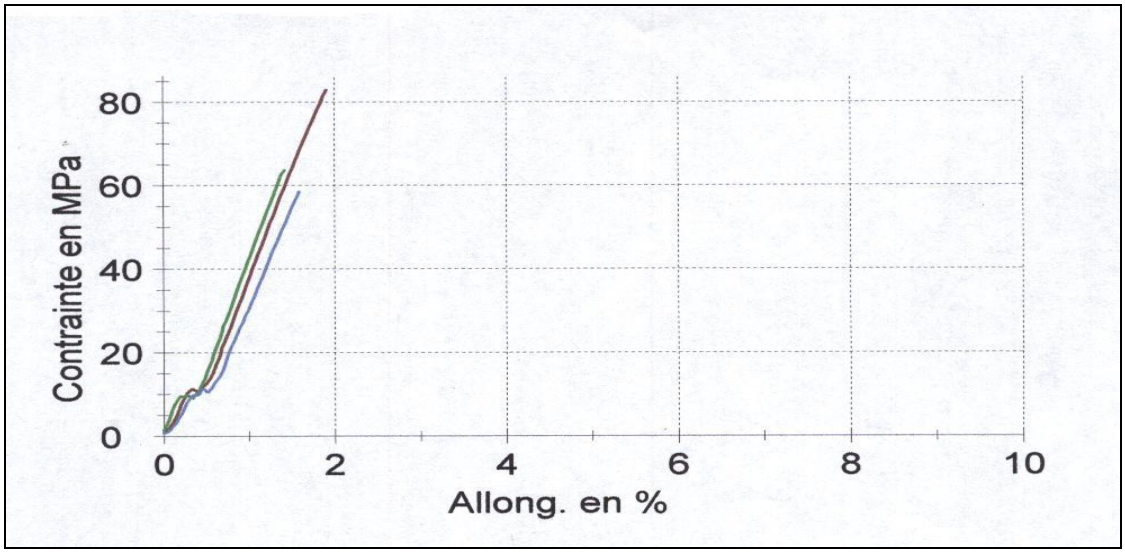
Annexe 1
Graphes des tests mécaniques de traction



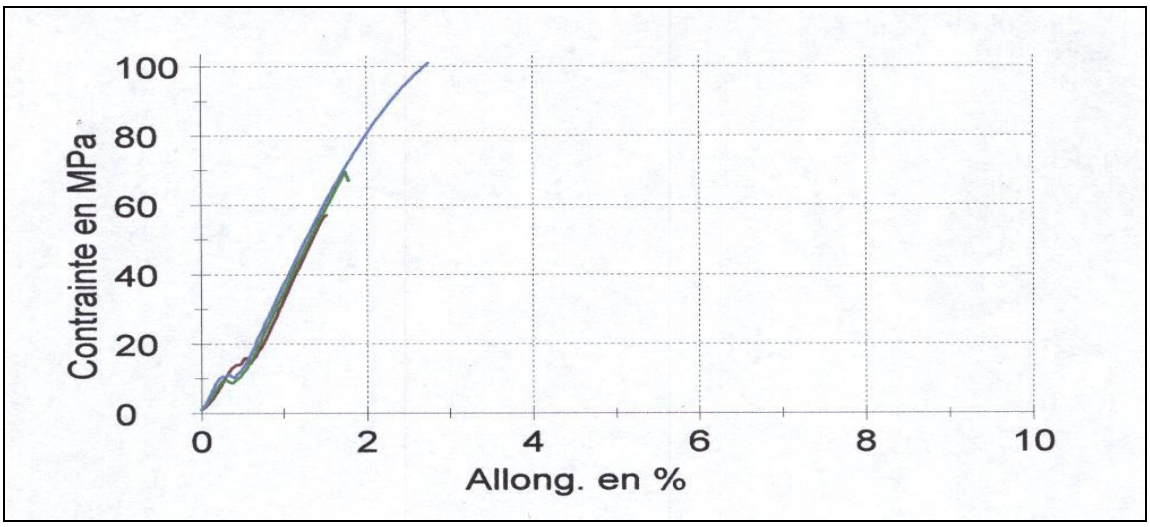
Graphe : contrainte-allongement pour la Gel A. à 0% en [GA]



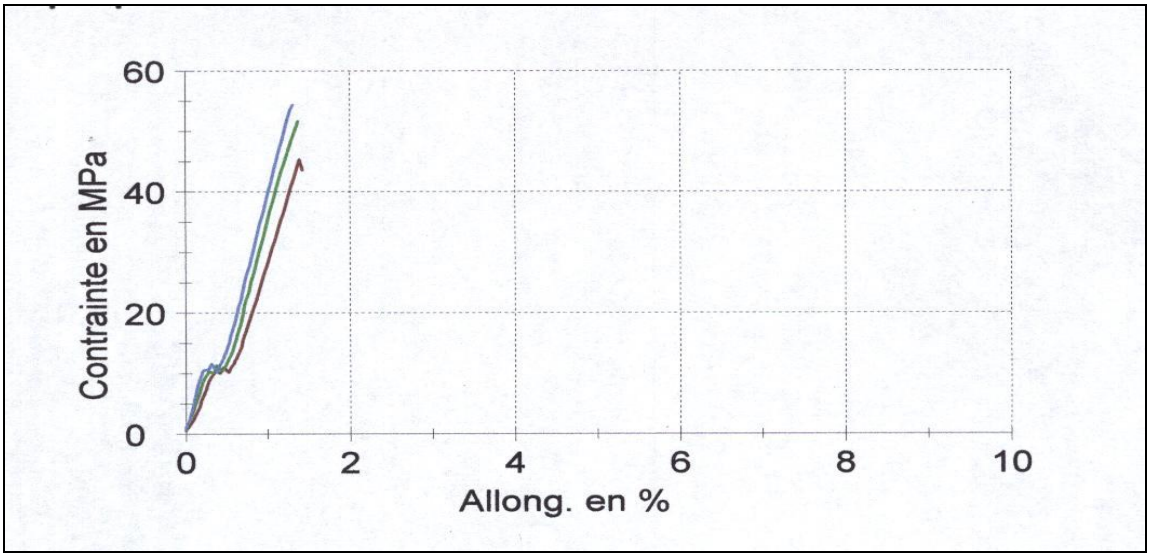
Graphe: contrainte -allongement pour la Gel A. à 0,5% en [GA]



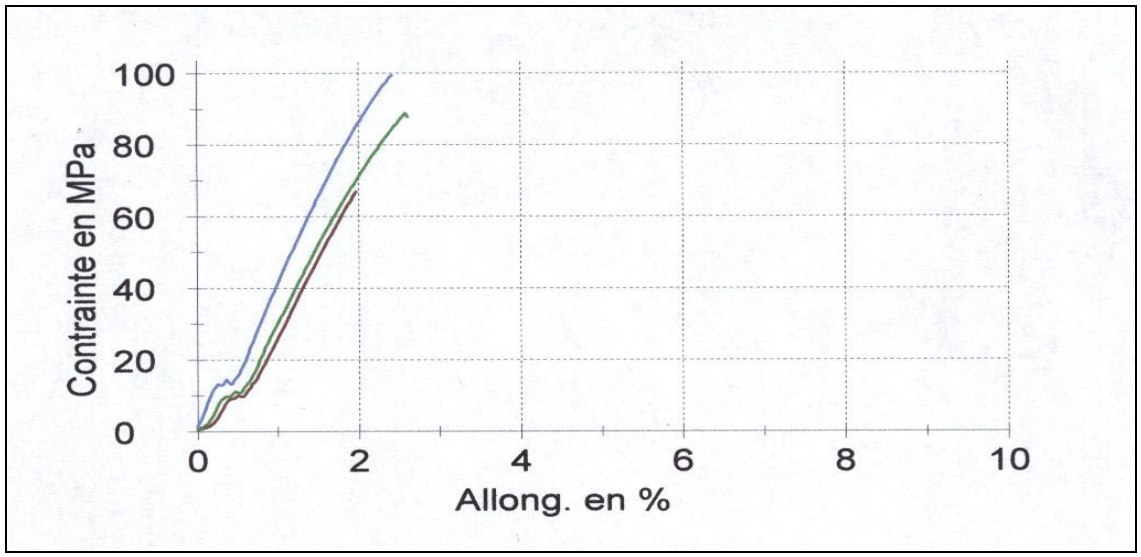
Graphe : contrainte -allongement pour la Gel A. à 1% en [GA]



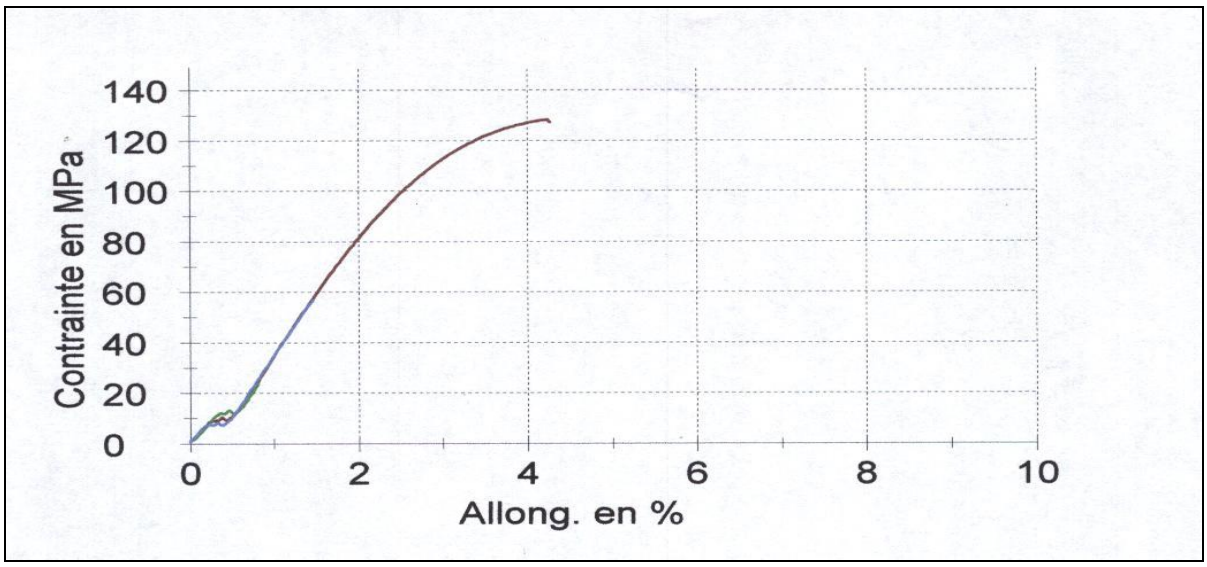
Graphe : contrainte -allongement pour la Gel A. à 1,5% en [GA]



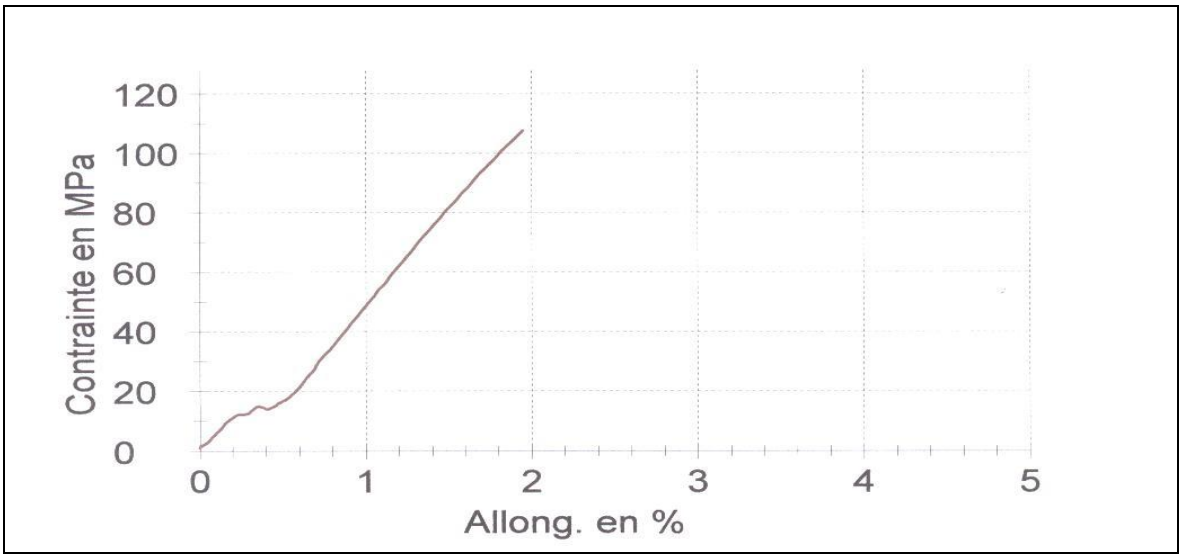
Graphe : contrainte -allongement pour la Gel A. à 2% en [GA]



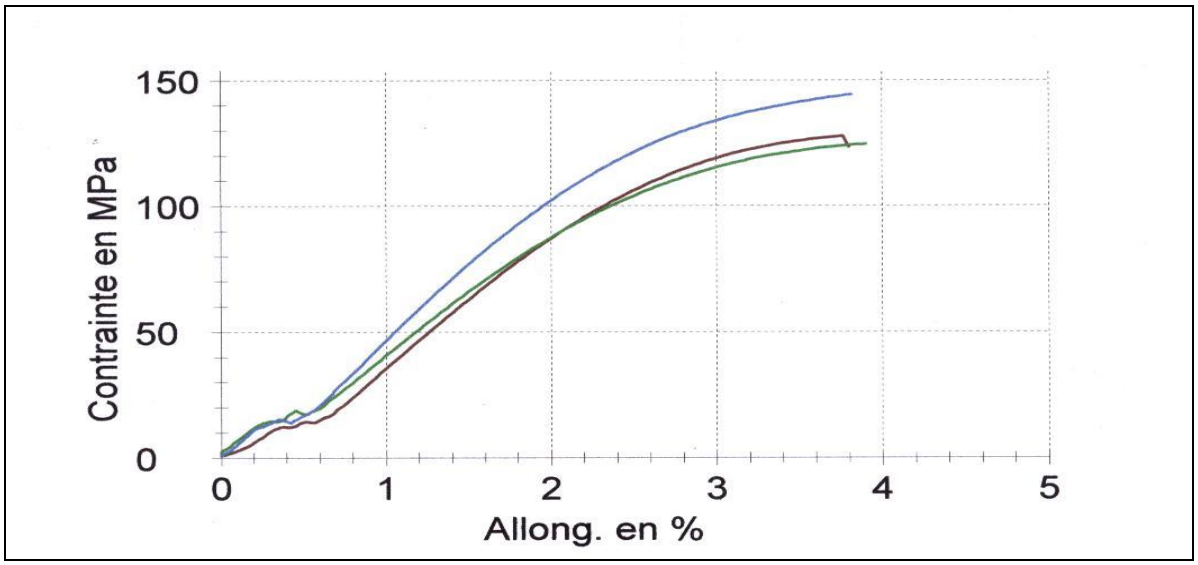
Graphe : contrainte -allongement pour la Gel A. à 2,5% [GA]



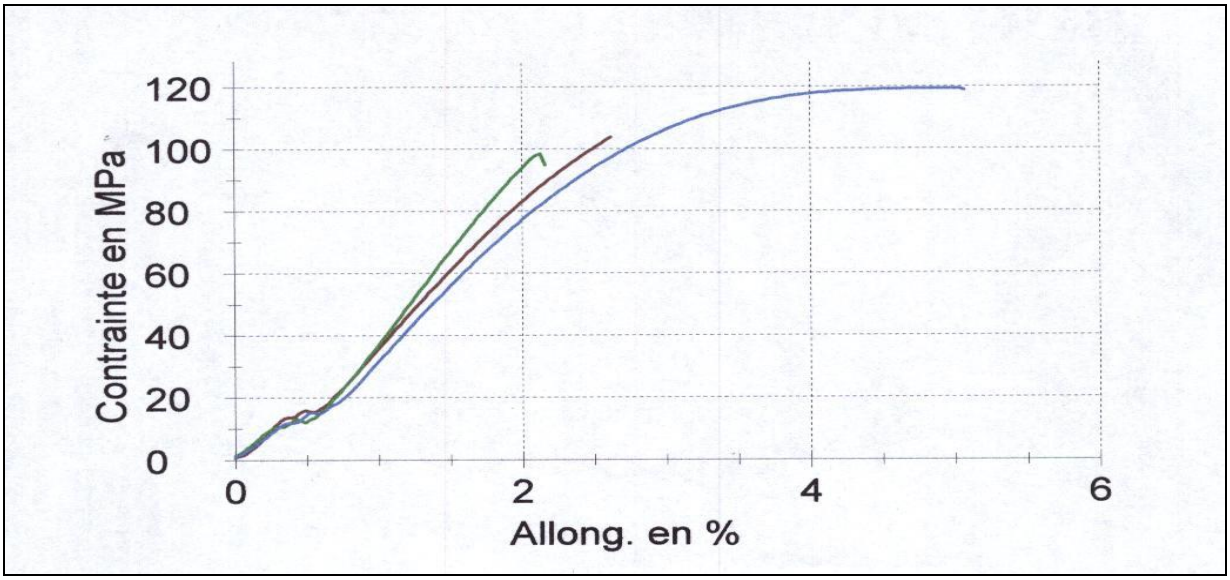
Graphe : contrainte -allongement pour la Gel A. à 3% en [GA]



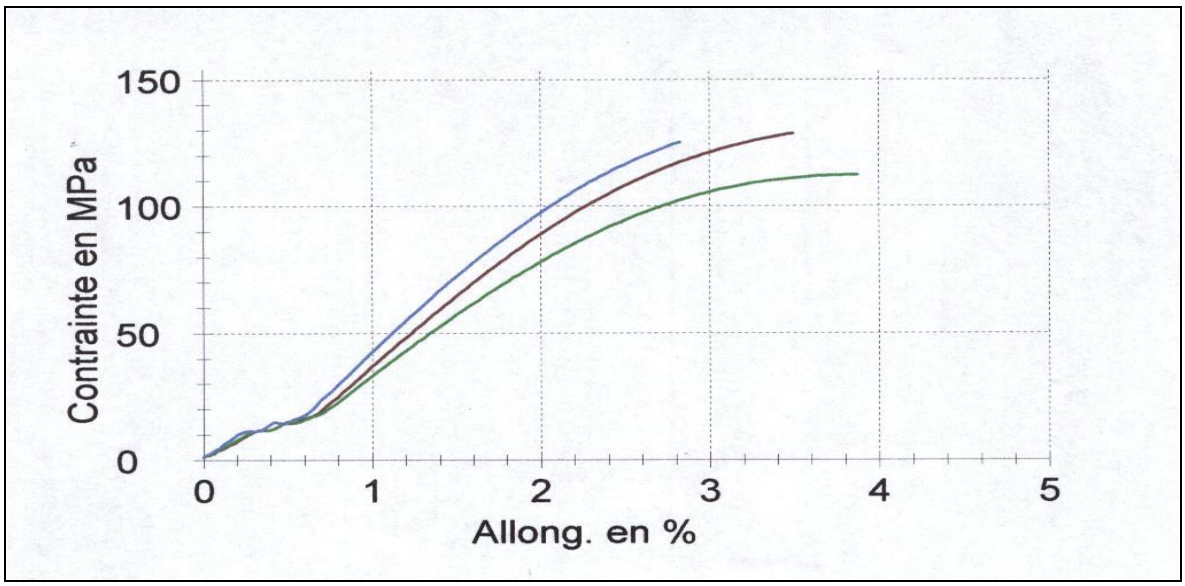
Graphe : contrainte -allongement pour la Gel V. à 0% en [GA]



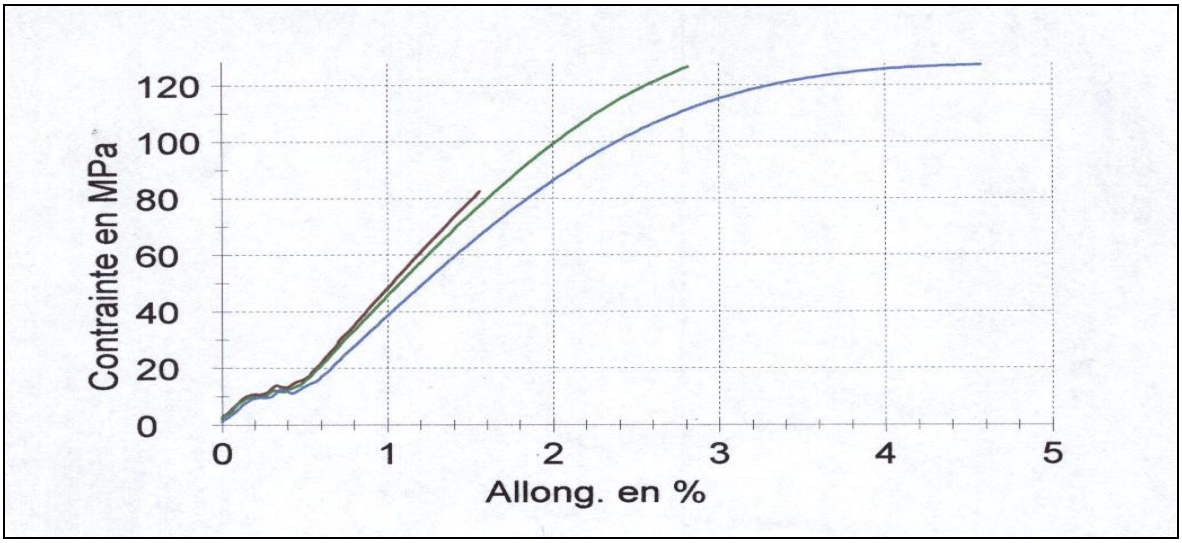
Graphe : contrainte -allongement pour la Gel V. à 0,5% en [GA]



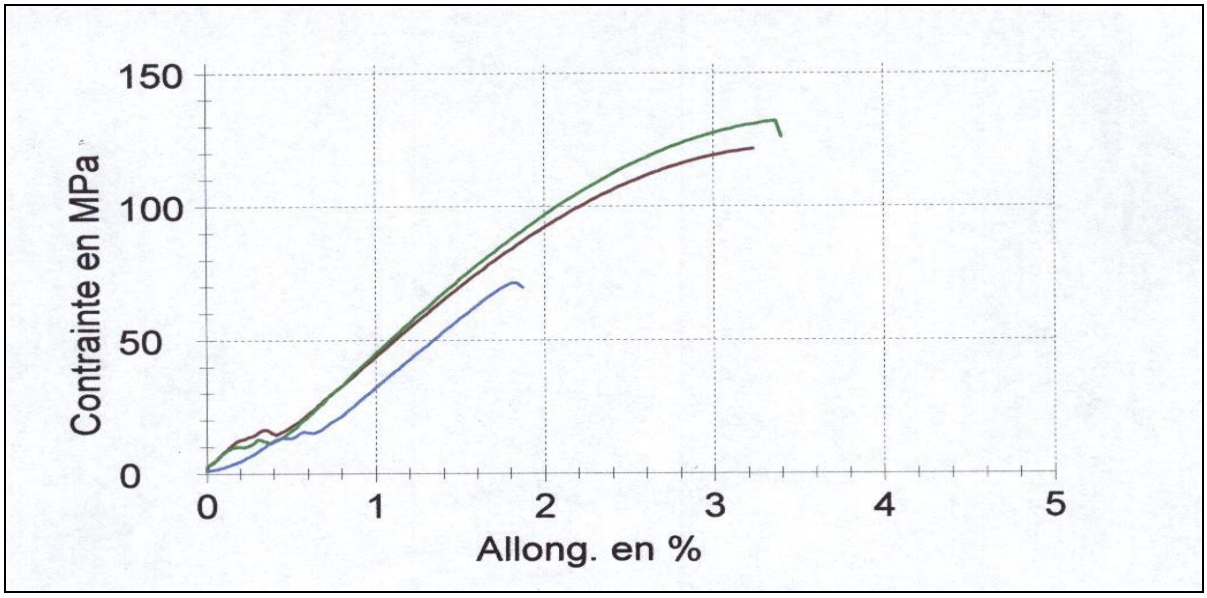
Graphe : contrainte -allongement pour la Gel V. à 1% en [GA]



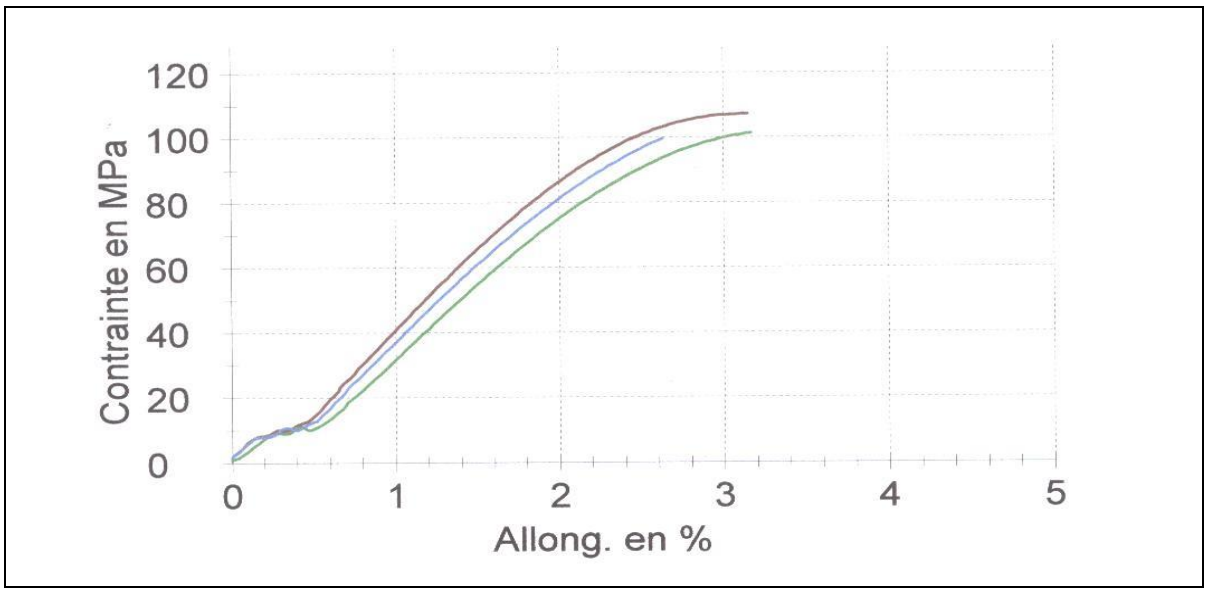
Graphe : contrainte -allongement pour la Gel V. à 1,5% en [GA]



Graphe : contrainte -allongement pour la Gel V. à 2% en [GA]

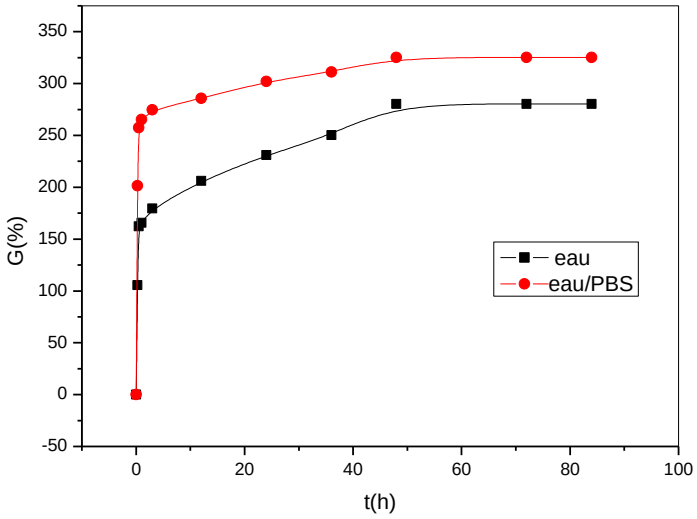


Graphe : contrainte -allongement pour la Gel V. à 2,5% en [GA]

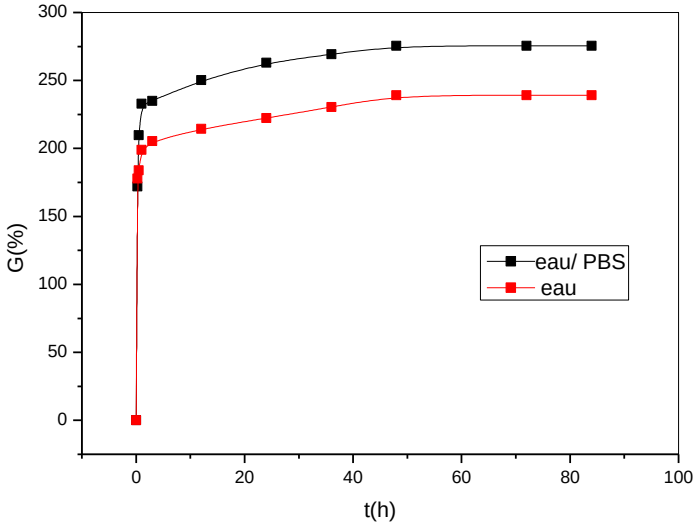


Graphe : contrainte -allongement pour la Gel V. à 3% en [GA]

Annexe 2
Courbes de gonflement

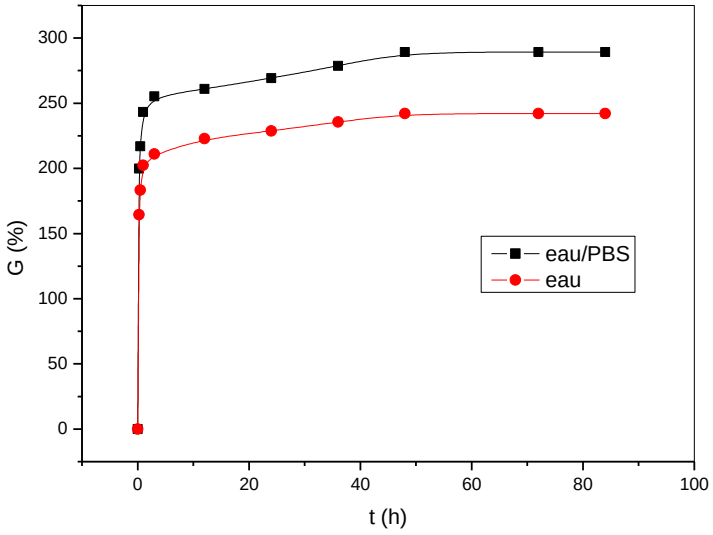


Variation du taux de gonflement du film de Gel A. à 0,5% en [GA] dans l'eau et dans (l'eau/ PBS) à T=37°C

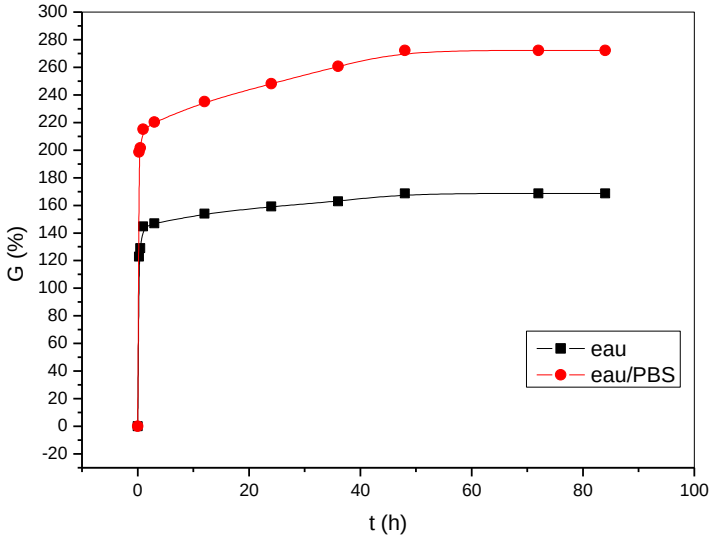


Variation du taux de gonflement du film de Gel A. à 1% en [GA] dans l'eau et dans (l'eau/ PBS)

à T= 37°C

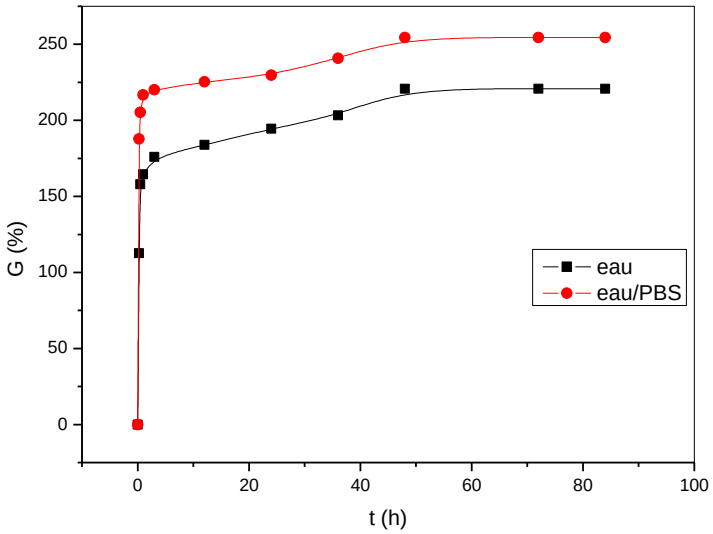


Variation du taux de gonflement du film de Gel A. à 1.5% en [GA] dans l'eau et dans (l'eau/ PBS) àT=37°C

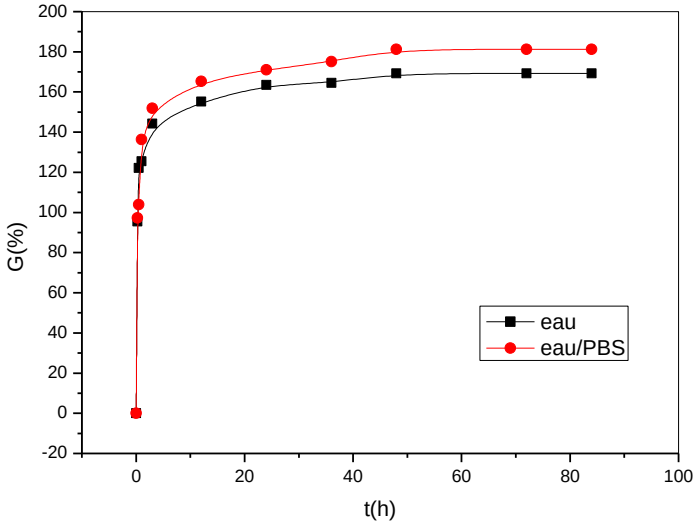


Variation du taux de gonflement du film de Gel A. à 2% en [GA] dans l'eau et dans (l'eau/ PBS)

à T= 37°C

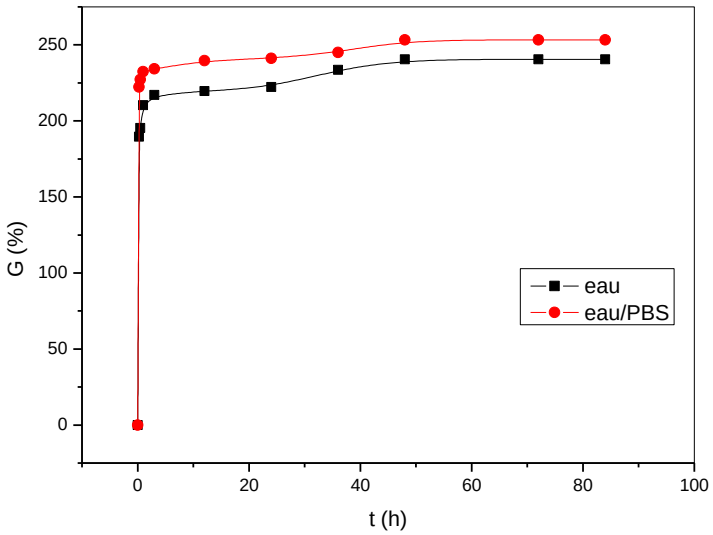


Variation du taux de gonflement du film de Gel A. à 2 ,5%en [GA] dans l'eau et dans (l'eau/ PBS) àT=37°C

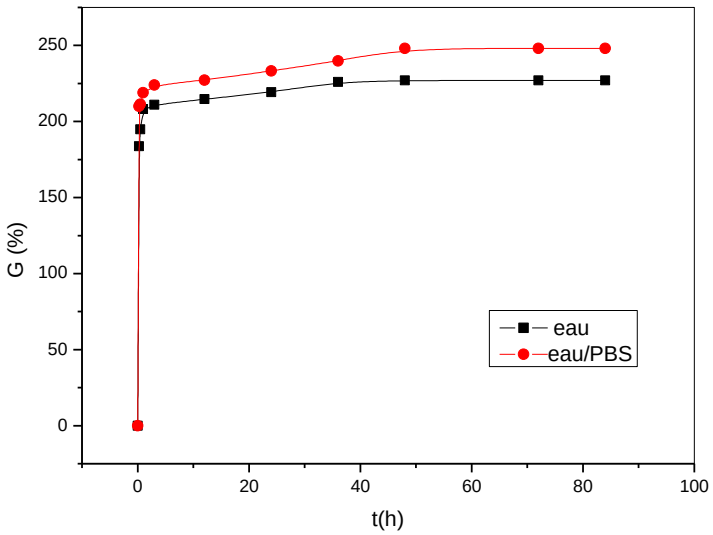


Variation du taux de gonflement du film de Gel A. à 3% en [GA] dans l'eau et dans (l'eau/ PBS)

à T= 37°C

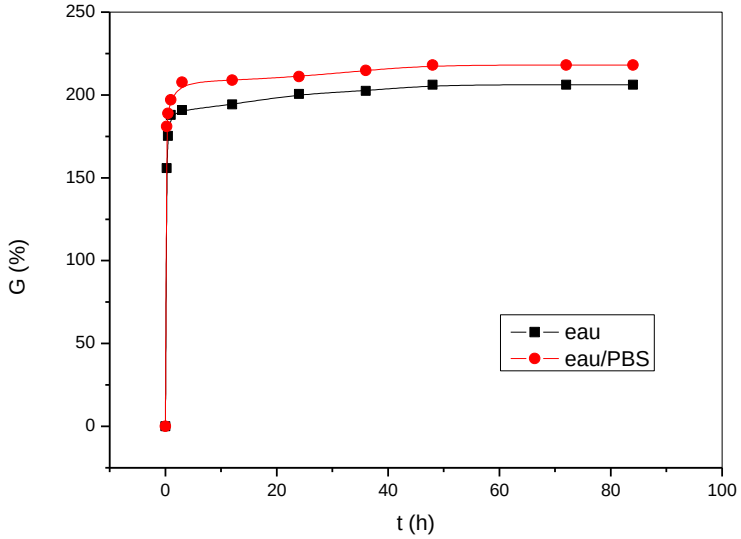


Variation du taux de gonflement du film de Gel V. à 0,5% en [GA] dans l'eau et dans (l'eau/ PBS) àT=37°C



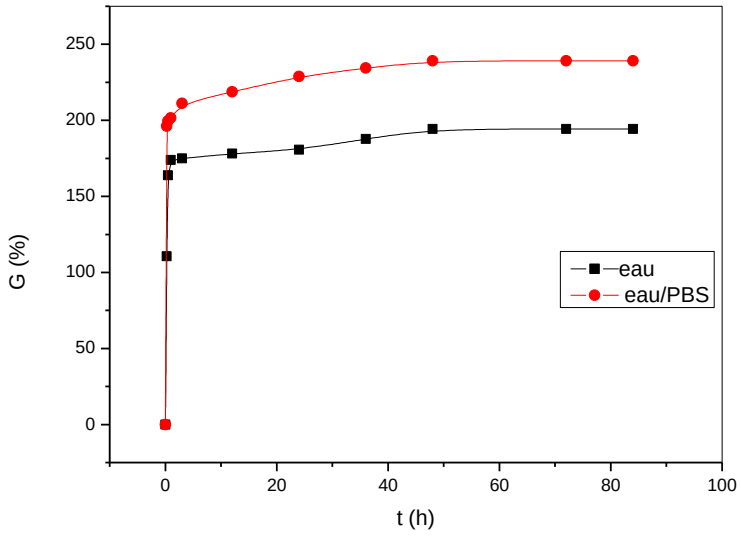
Variation du taux de gonflement du film de Gel V. à 1% en [GA] dans l'eau et dans (l'eau/ PBS)

à T= 37°C



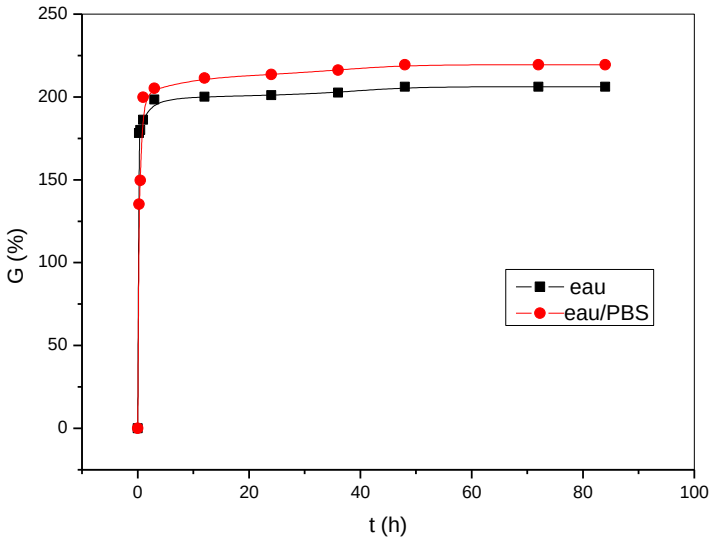
Variation du taux de gonflement du film de Gel V. à 1,5% en [GA] dans l'eau et dans (l'eau/ PBS)

à T=37°C

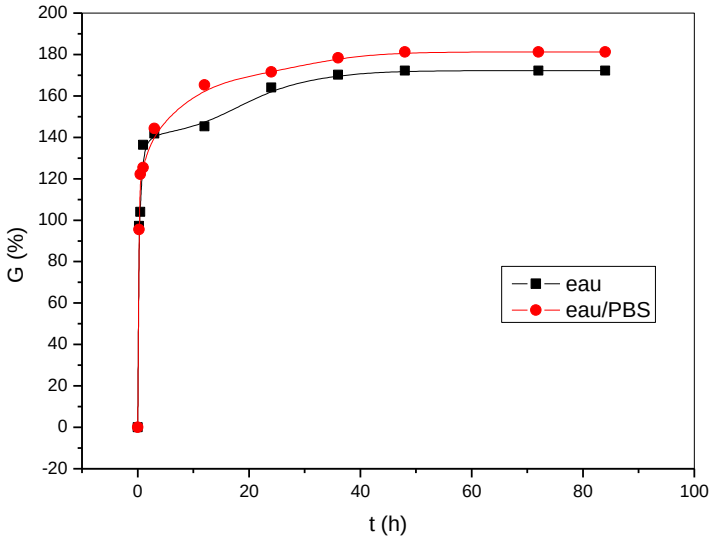


Variation du taux de gonflement du film de Gel V. à 2% en [GA] dans l'eau et dans (l'eau/ PBS)

à T= 37°C



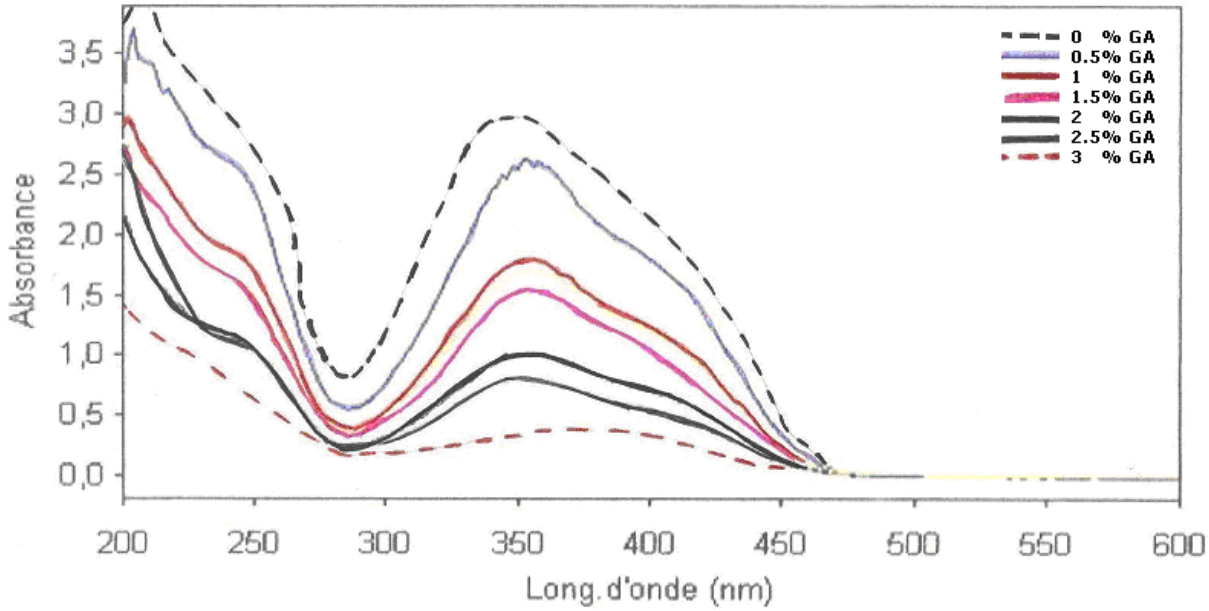
Variation du taux de gonflement du film de Gel V. à 2,5% en [GA] dans l'eau et dans (l'eau/ PBS) àT=37°C



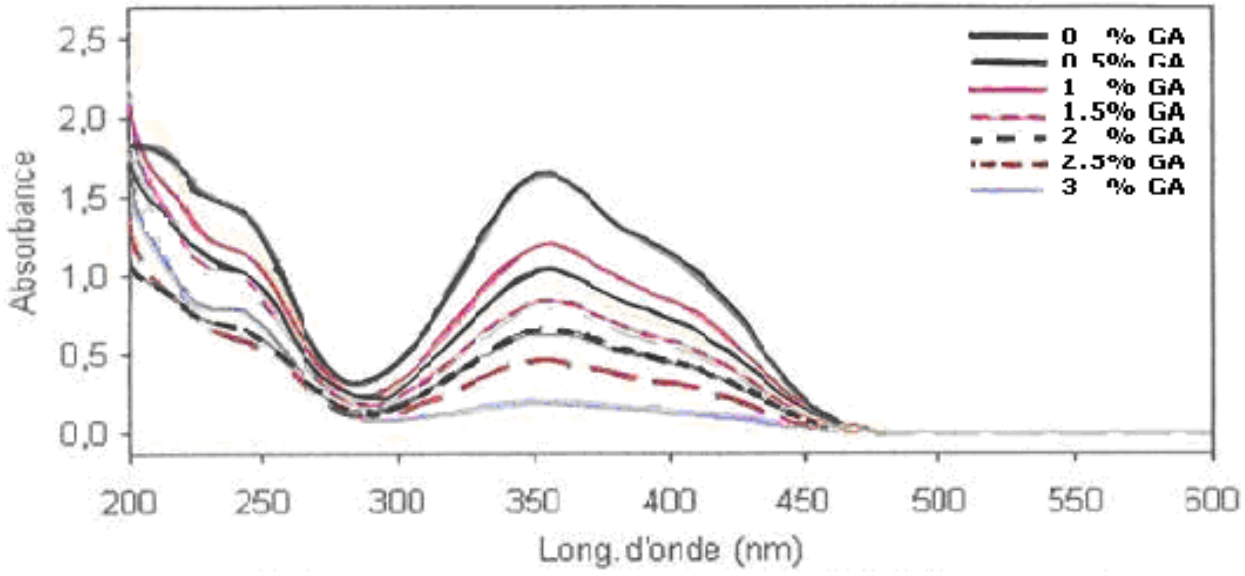
Variation du taux de gonflement du film de Gel V. à 3% en [GA] dans l'eau et dans (l'eau/ PBS)

à T= 37°C

Annexe 3
Spectres UV Vis du test de T.N.B.S

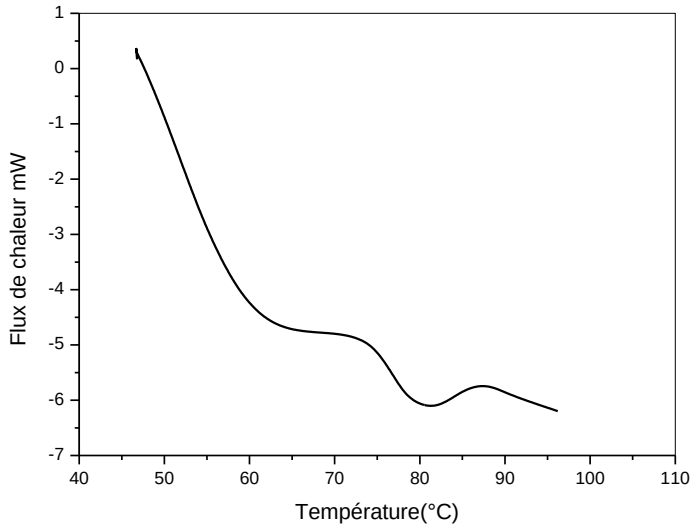


Spectre UV-Vis pour les différents films de Gel A.

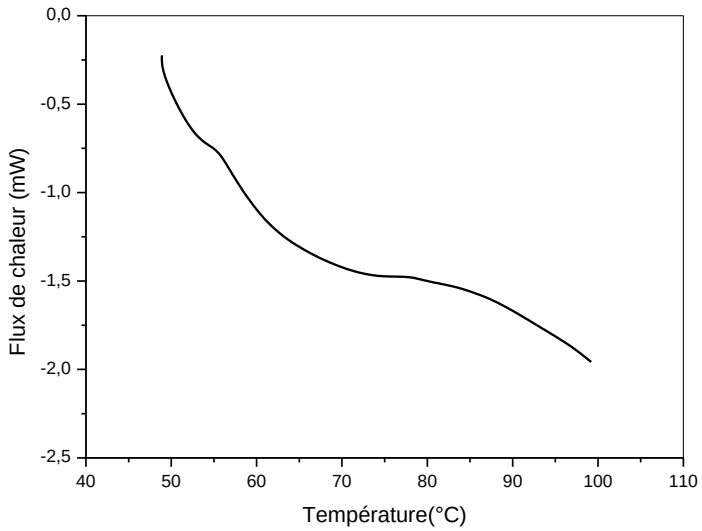


Spectre UV-Vis pour les différents films de Gel V.

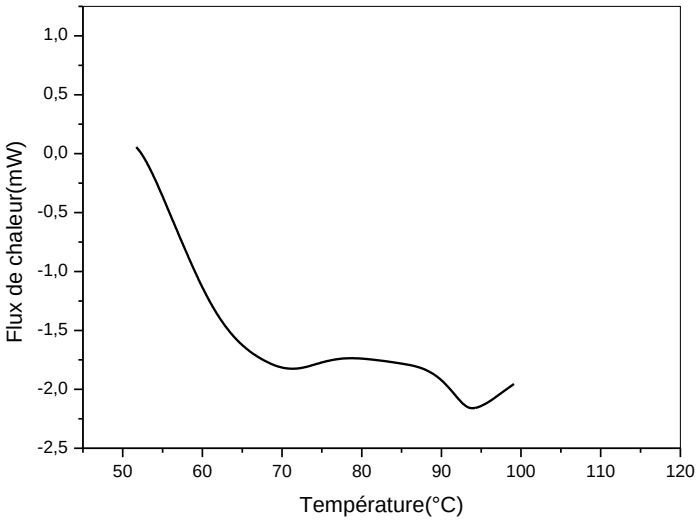
Annexe 4
Thermogrammes de la D.S.C.



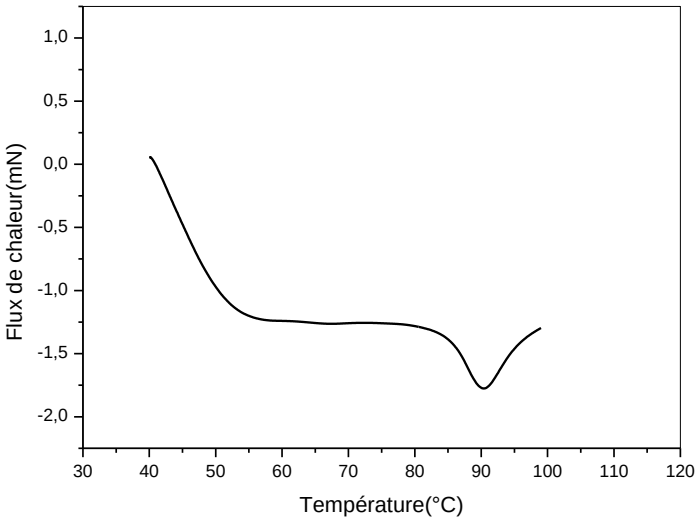
Thermogramme de D.S.C de la Gel A en poudre



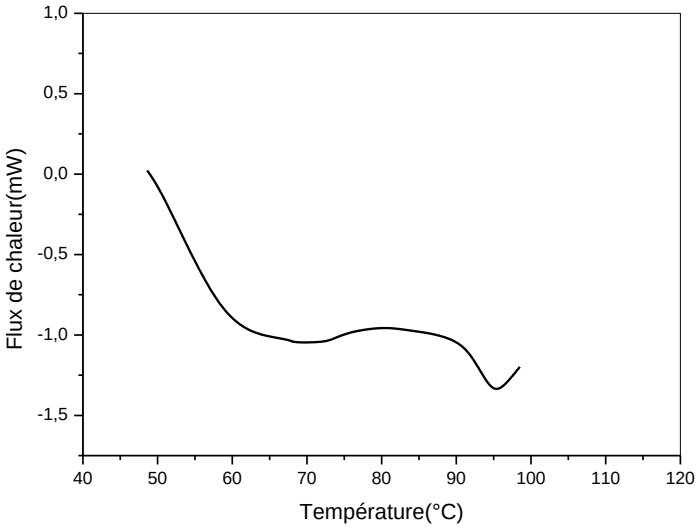
Thermogramme de D.S.C de la Gel A; à 1,5% en [GA]



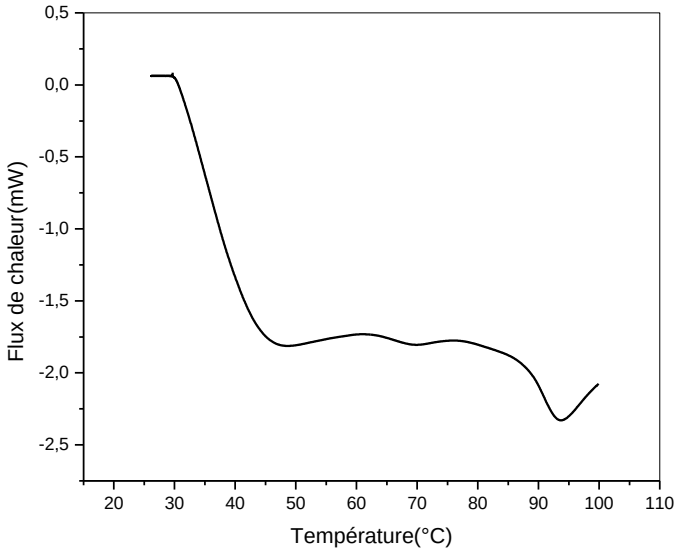
Thermogramme de D.S.C de la Gel A ;à 2% en [GA]



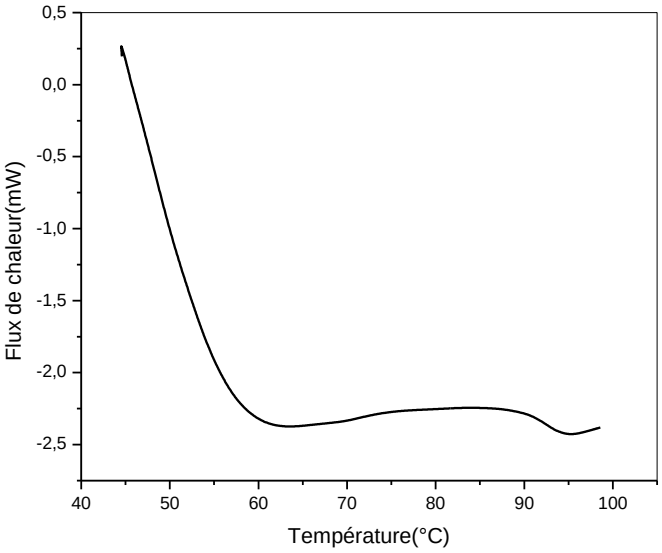
Thermogramme de D.S.C de la Gel A; à 2,5% en [GA]



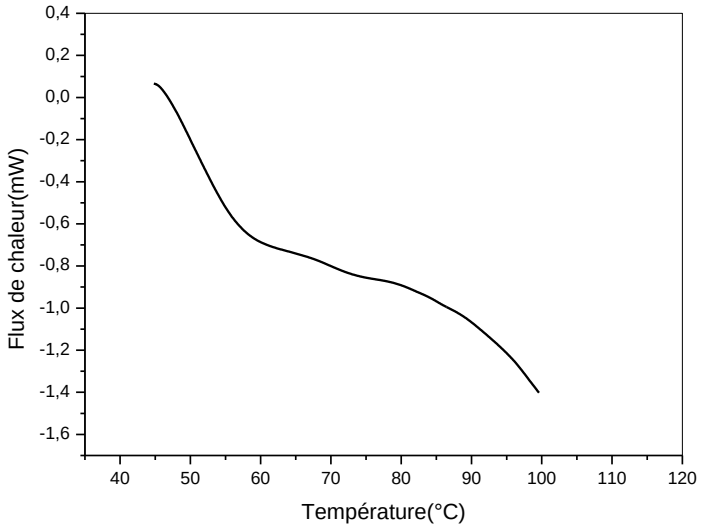
Thermogramme de D.S.C de la Gel V en poudre



Thermogramme de D.S.C de la Gel V ; à 1,5% en [GA]



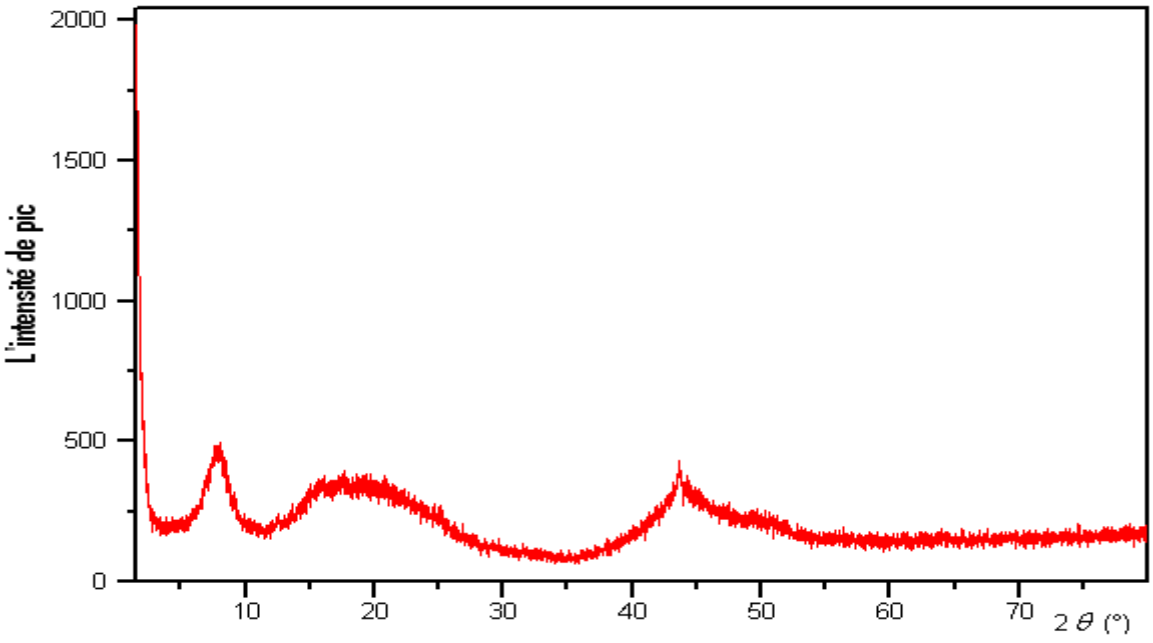
Thermogramme de D.S.C de la Gel V ; à 2 % en [GA]



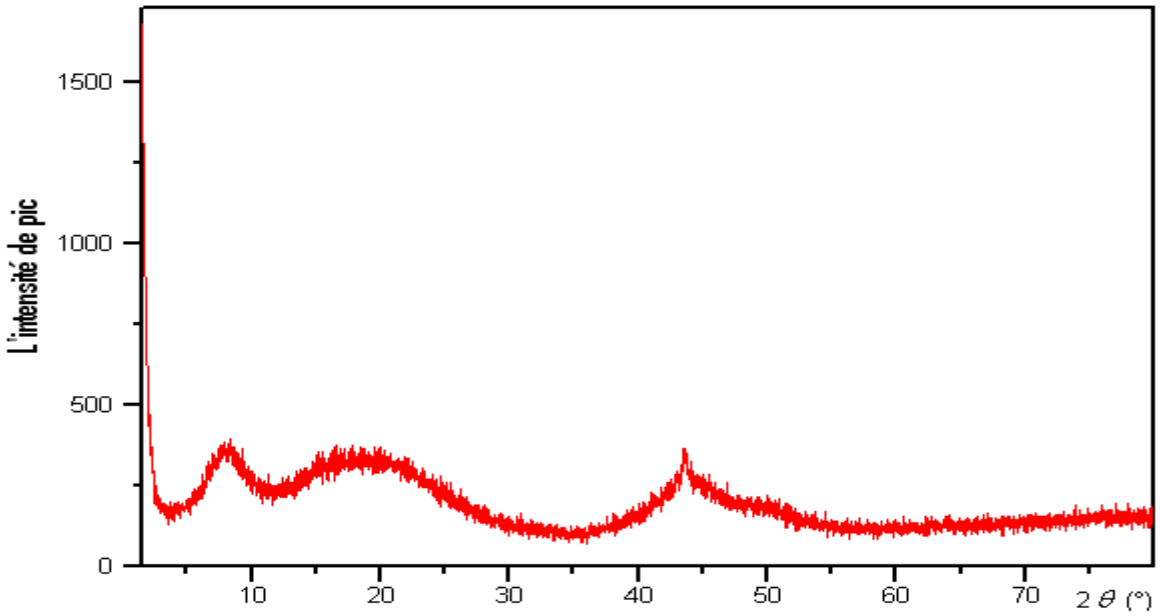
Thermogramme de D.S.C de la Gel V ; à 2,5% en [GA]

Annexe 5

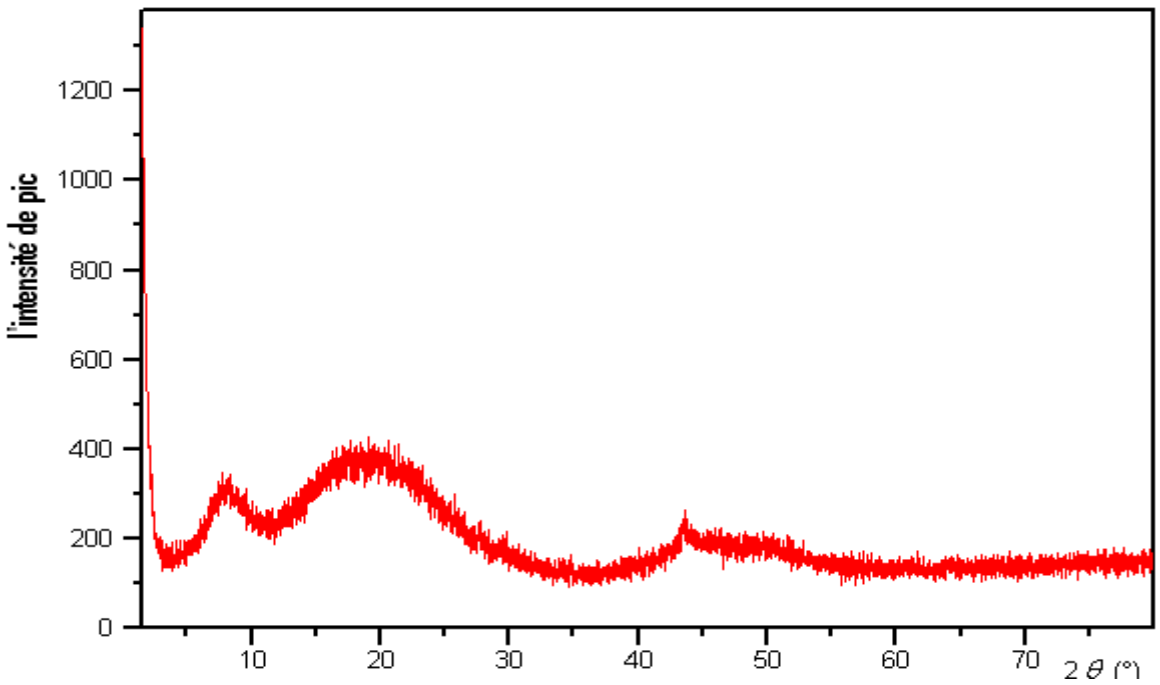
Diffractogrammes des rayons-X



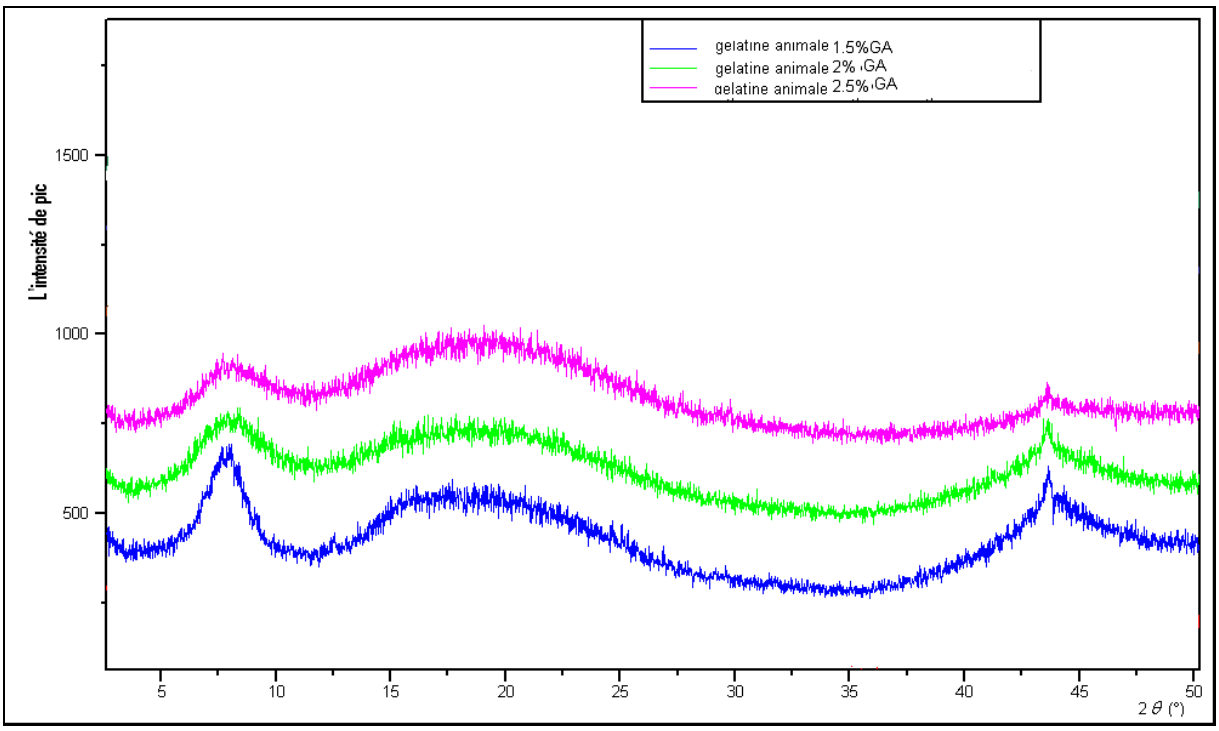
Difractogramme des rayons-X de la Gel A. 1,5 % en [GA]



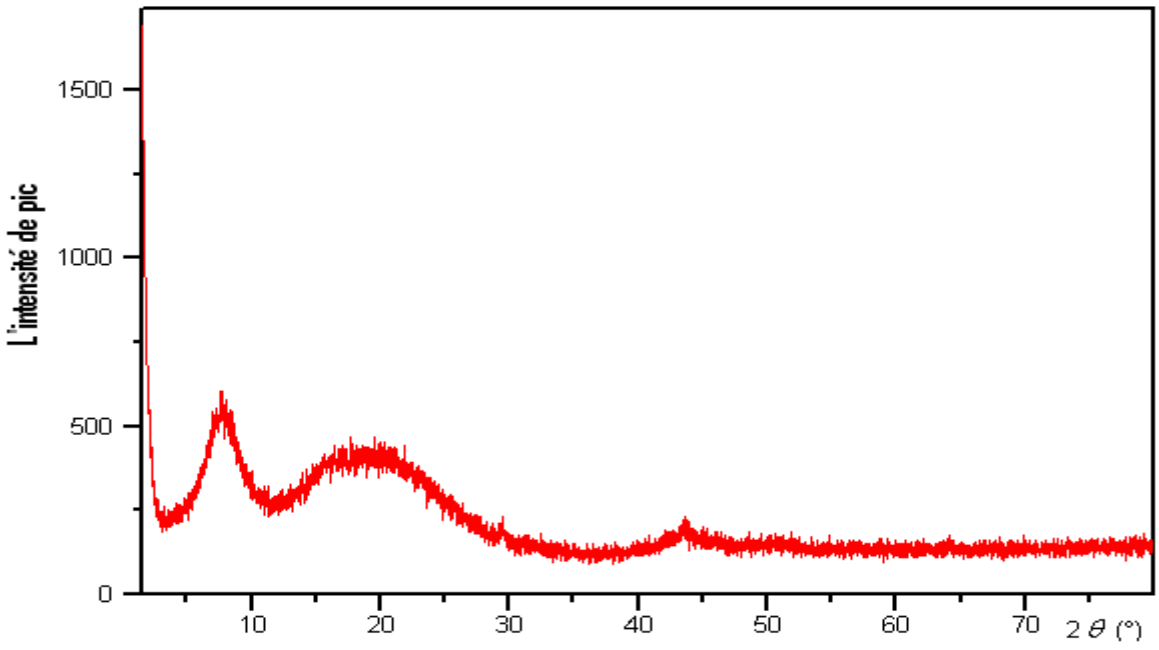
Difractogramme des rayons-X de la Gel A. 2 % en [GA]



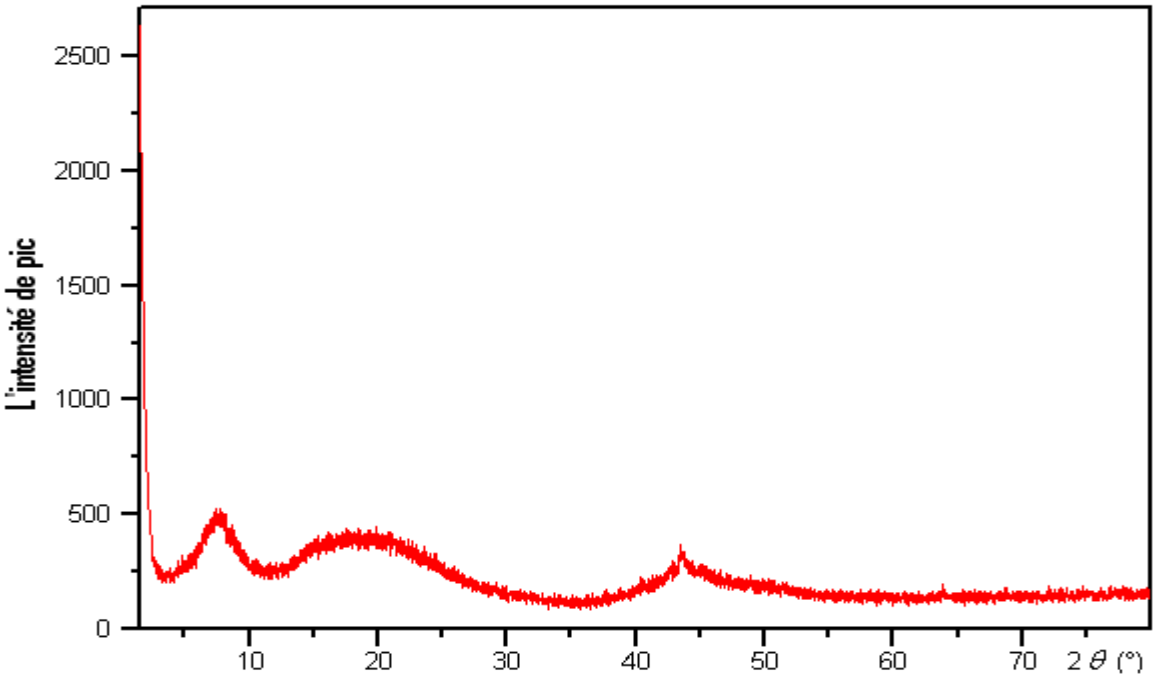
Difractogramme des rayons-X de la Gel A 2,5 % en [GA]



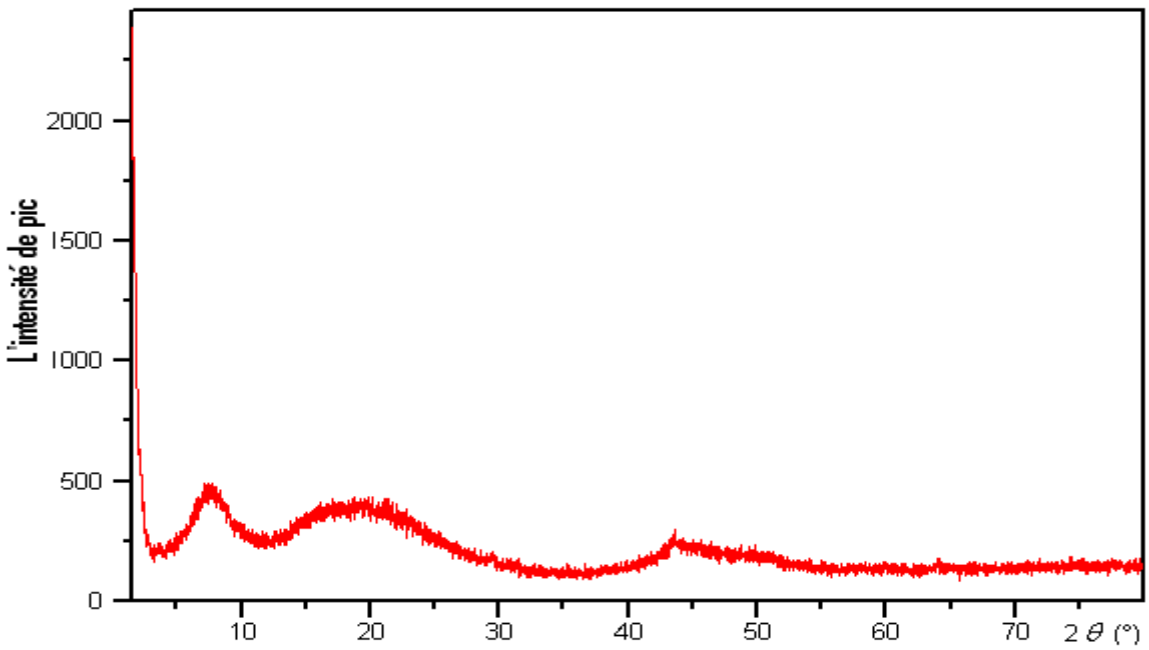
Difractogrammes des rayons-X pour les 3 les films de Gel A.



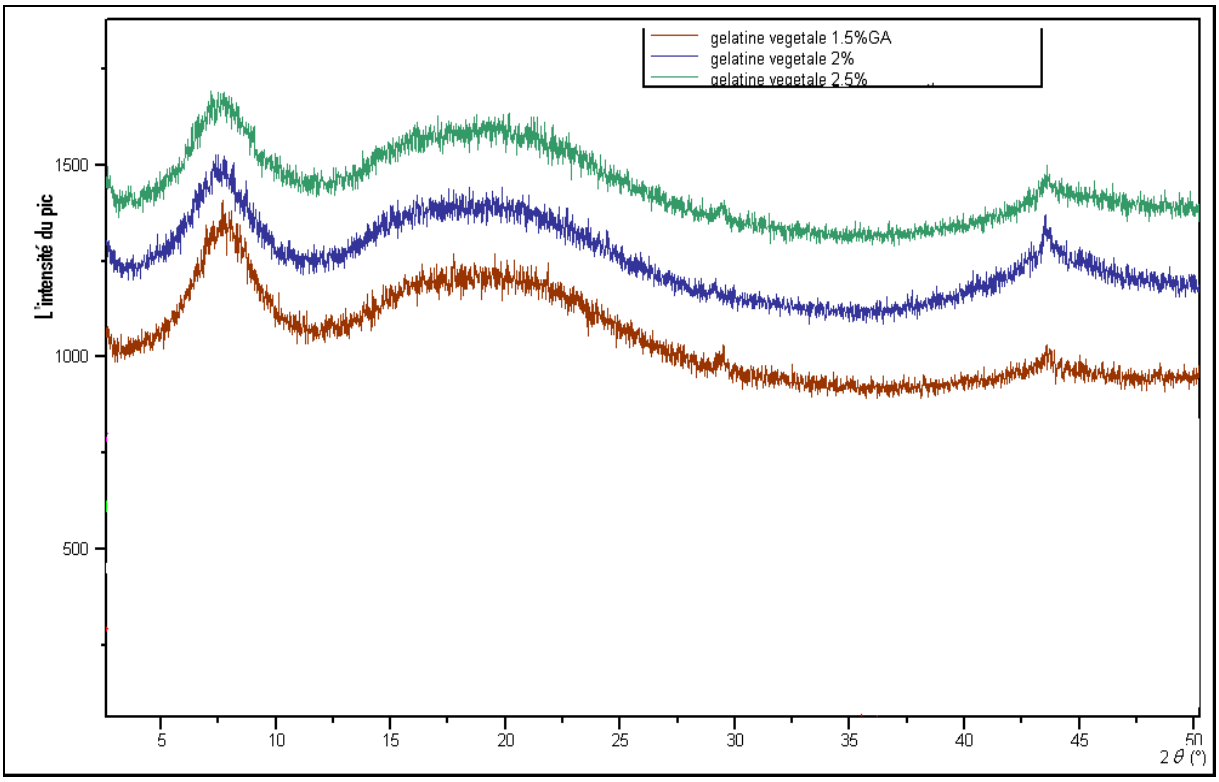
Difractogramme des rayons-X de la Gel V. 1,5 % en [GA]



Difractogramme des rayons-X de la Gel V. 2 % en [GA]



Difractogramme des rayons-X de la Gel V. 2,5 % en [GA]



Difractogrammes des rayons-X pour les 3 les films de Gel V.