

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE FERHAT ABBAS –SETIF-1
UFAS-1 (ALGERIE)

THÈSE

Présentée à :
La Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés
Pour l'obtention du Diplôme de

DOCTORAT

Domaine : Sciences et Technologie
Filière : Génie des Procédés
Option : Génie des Procédés Pharmaceutiques

Par :

M^{lle} LOUCIF KHADIDJA

THÈME

Études chimique et biologique de l'alginate de sodium oxydé par l'hypochlorite de sodium ou conjugué à la gélatine à travers la réaction de Maillard.

Présentée et soutenue le : / / 2018

CHAFAA Salah	Professeur	Université de Sétif 1	Président
BOUNEKHEL Mahmoud	Professeur	Université de Sétif 1	Directeur
ELKOLLI MERBAH Meriem	Professeur	Université de Sétif 1	Co-directeur
BOUZID Djallel	Professeur	Université de Constantine 3	Examineur
HARKAT Hassina	Professeur	Université de Batna	Examinatrice
CHEBLI Derradji	MCA	Université de Sétif 1	Examineur

Remerciements

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

Je voudrais offrir mes sincères remerciements à certaines personnes sans qui je n'aurais pu mener à bien ce projet de maîtrise.

*En premier lieu, je désire remercier mon directeur de thèse, **Monsieur Le Professeur Bounekhel Mahmoud**, pour son expérience, ses précieux conseils et le soutien exceptionnel qu'il m'a offert. Je le remercie également pour son accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité son aide, ainsi que pour ses multiples encouragements.*

*Je tiens aussi à remercier ma co-directrice, **Madame La Professeure Elkolli Merbah Meriem**, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'elle a consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et son respect sans faille des délais serrés de relecture des documents que je lui ai adressés. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.*

*Je tiens également à remercier plus particulièrement **Melle Chetouani Asma**, pour son implication, sa disponibilité et son écoute. Sans elle, bien des tâches auraient été difficiles à accomplir.*

Tous trois m'ont offert une grande disponibilité, ont fait preuve de patience et m'ont offert un soutien moral qui a été très apprécié. Grâce à eux, j'ai pu développé une confiance en moi et mon autonomie afin de réaliser ce projet.

*Je suis profondément sensible à l'honneur que **Monsieur Le Professeur Chafaa Salah** m'a fait en acceptant de présider mon jury de soutenance. Je lui transmets toutes les expressions de mes profonds respects et de mes distinguées considérations.*

*Je remercie **Monsieur Le Professeur Bouzid Djallel** d'avoir accepté avec bienveillance de se déplacer pour juger ce travail. Sa présence honore mon jury. Qu'il reçoive l'expression de mes sincères remerciements.*

*Je remercie **Madame La Professeure Harkat Hassina** d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Votre participation à mon jury de soutenance a été un grand honneur pour moi.*

*Je remercie **Monsieur Le docteur Chebli Derradji** d'avoir accepté de consacrer de son temps à juger cette thèse et de nous honorer par sa présence à ma soutenance en tant que membre de mon jury.*

*Je remercie également tous les membres du **LMPMP-UFAS de Sétif-1** et spécialement **Zohra, Saida et Lamia**, pour toute l'aide apportée, le soutien et l'amitié qu'ils m'ont témoignés.*

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,

l'amour, le respect, la reconnaissance...

Aussi, c'est tout simplement que...

Je dédie cette thèse

À la mémoire de mon père,

À ma mère,

À mes chers frères et mes chères sœurs,

À mon fiancé,

À mes ami(e)s,

À tous ceux qui me sont chers.

Sommaire

Remerciements	i
Dédicaces	ii
Sommaire	iii
Liste des abréviations	viii
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xiv
Introduction générale	1

PATRIE I : OXYDATION DE L'ALGINATE DE SODIUM PAR L'HYPOCHLORITE DE SODIUM

CHAPITRE I : Étude bibliographique sur les polysaccharides et l'alginate.

I. Les polysaccharides	3
II. Types de polysaccharides	4
II.1 Polysaccharides cationiques	4
- Chitosane	4
II.2. Polysaccharides neutres	4
-Amidon	4
II.3. Polysaccharides anioniques	6
1. Acide hyaluronique ou hyaluronate	6
2. Alginate de sodium.....	6
2.1. Composition de l'alginate.....	7
2.2. Propriétés physico-chimiques.....	9
2.3 Procédés d'extraction.....	13
2.4 Modification chimique de l'alginate de sodium :.....	16
2.4.1. Modifications chimiques des groupes d'hydroxyles :.....	16
1. Oxydation :	16
2. Amination réductrice de l'alginate oxydé :	18
3. Sulfatation :.....	19
4. Copolymérisation :	19

5. Cyclodextrine-alginate liés :	20
2.4.2 Modifications chimiques des groupes carboxyliques	20
1. Estérification	20
2. Réaction d'Ugi :	21
3. Amidation	22
2.5. Applications industrielles :	22

CHAPITRE II : Partie expérimentale.

I. Produits utilisés	25
II. Méthodes.....	25
II.1 Préparation des films d'alginate et d'alginate oxydés	25
II.2 Dosage chimique	26
II.2.1 Détermination de la teneur en carbonyle	26
II.2.2 Détermination de la teneur en carboxyle	27
II.2.3 Détermination de la teneur en aldéhyde.....	27
II.2.4 Titrations potentiométrique et conductimétrique.....	28
II.3 Etude structurale.....	29
II.3.1 Spectrophotométrie infrarouge (IR-TF)	29
II.3.2 Spectrophotométrie UV-Vis.....	29
II.3.3 Radiocristallographie par diffraction des rayons X (DRX).....	29
II.3.4 Microscopie à force atomique (AFM).....	30
II.4 Etude mécanique par le test du gonflement.....	31
II.5 Etudes biologiques	31
II.5.1 Biocompatibilité des films avec le sang humain.....	31
II.5.2 Activité anti-inflammatoire	32
II.5.3 Activité antibactérienne.....	32

CHAPITRE III : Résultats et discussion.

I. Dosages chimiques.....	34
I.1 Teneur en carbonyle	34
I.2 Teneur en carboxyle :	34

I.3 Teneur en aldéhyde.....	35
I.4 Titrations potentiométrique et conductimétrique :	36
II. Etude structurale	38
II.1 Spectrophotométrie infrarouge (IR-TF) :	38
II.2 Spectrophotométrie UV-Vis :	41
II.3 Diffraction des rayons X.....	42
II.4 Microscopie à force atomique (AFM) :.....	43
III. Etude mécanique par test de gonflement	45
IV. Etudes biologiques	46
IV.1 Biocompatibilité des films avec le sang humain	46
IV.2Activité anti-inflammatoire :	47
IV.3Activité antibactérienne :.....	48

PATRIE II : LA RÉACTION DE MAILLARD

CHAPITRE I : Généralités sur la réaction de Maillard

I. Histoire de la réaction de Maillard	51
II. Etapes de la réaction de Maillard	51
II.1 Etape initiale	52
II.2 Etape intermédiaire	53
II.3 Etape finale	55
III. Facteurs influençant la réaction de Maillard	57
III.1 Facteurs réactionnels	57
III.2 Réactants.....	59
IV. Propriétés des produits de la réaction de Maillard	61
V. Applications de la réaction de Maillard.....	61
VI. Réaction de Maillard <i>in vivo</i>	62

CHAPITRE II : Partie expérimentale

I. Produits utilisés	64
II. Méthodes.....	64

II.1 Préparation des films.....	64
II.2 Identification et caractérisation.....	65
II.2.1 Mesure du pH.....	65
II.2.2 Intensité de brunissement.....	65
II.2.3 Détermination par la méthode de TNBS du nombre de moles des ϵ -amino.....	66
II.2.4 Dosages chimiques.....	67
II.2.4.1 Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA).....	67
II.2.4.2 Détermination des groupes aminés libres par titrage pH-métrique.....	69
II.2.5 Etudes structurales.....	69
II.2.5.1 Spectrophotométrie infrarouge IF-TR :.....	69
II.2.5.2 Radiocristallographie par diffraction des rayons X (DRX).....	70
II.2.5.3 Analyse thermogravimétrique (ATG).....	70
II.2.5.4 Microscopie à force atomique (AFM).....	70
II.2.6 Etudes biologiques.....	70
II.2.6.1 Activité antioxydante par la méthode du DPPH.....	70
II.2.6.2 Pouvoir réducteur.....	71
II.2.6.3 Activité anti inflammatoire:.....	71
II.2.6.4 Activité antibactérienne.....	71

CHAPITRE III : Résultats et discussion.

I. Mesure du pH.....	72
II. Intensité de brunissement.....	73
Intensité de brunissement en fonction du pH.....	74
Intensité de brunissement en fonction du temps de chauffage à pH=11.....	75
III. Détermination du nombre de moles des ϵ -amino groupes par le TNBS.....	77
IV. Dosage des protéines par l'acide Bicinchoninique (BCA).....	78
V. Détermination des amino-groupes libres.....	80
VI. Spectroscopie IR-TF :.....	81
VII. Diffraction des rayons X.....	87
VIII. Analyse thermogravimétrique (ATG).....	88
IX. Microscopie à force atomique (AFM).....	89

X. Activité antioxydante :	91
X.1. Activité antioxydante par la méthode du DPPH :	91
X.2. Pouvoir réducteur.....	93
XI. Activité anti inflammatoire	94
XII. Activité antibactérienne :.....	95
Conclusion	98
Références bibliographiques	100
Annexes	109

LISTE DES ABRÉVIATIONS.

ADEME : Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie

AFM : Microscopie à force atomique

AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens

AGE : Advanced Glycated End products

ATG : Analyse thermogravimétrique

BCA : acide bicinchoninique

Blocs GG : ensembles d'homopolymères de motifs G

Blocs MG : ensembles d'homopolymères de motifs M et G respectivement

Blocs MM : ensembles d'homopolymères de motifs M

DRX : Diffraction des rayons X

DPPH : 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyle

G : α -L-gulonate

M : β -D-mannuronate

MRPs : produits de la réaction de Maillard

NaAlg: Alginate de sodium

OAlg1 : Alginate oxydée par l'hypochlorite à 0.25%

OAlg2 : Alginate oxydée par l'hypochlorite à 0.75%

OAlg3 : Alginate oxydée par l'hypochlorite à 1.5%

OAlg4 : Alginate oxydée par l'hypochlorite à 3%

OM : orbitale moléculaire

PTG : Produits Terminaux de Glycation

pI : point isoélectrique

TG% : taux de gonflement en %

TNBS : acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique

LISTE DES FIGURES.

PATRIE I : OXYDATION DE L'ALGINATE DE SODIUM PAR L'HYPOCHLORITE DE SODIUM

CHAPITRE I : Étude bibliographique sur les polysaccharides et l'alginate.

Figure I.1 : Exemple d'une liaison osidique.....	3
Figure I.2 : Représentation schématique d'une chaîne de chitosane	4
Figure I.3 : Structure chimique de l'amylose	5
Figure I.4 : Structure chimique de l'amylopectine.....	5
Figure I.5 : Structure chimique de l'acide hyaluronique	6
Figure I.6 : (a) <i>Japonica de Laminaria</i> , (b) <i>Hyperborea de Laminaria</i> , (c) <i>Pyrifera de Macrocystis</i> , (d) <i>Digitata de Laminaria</i> , (f) <i>Nodosum d'Ascophyllum</i>	7
Figure I.7 : Monomères composant la chaîne alginate	7
Figure I.8 : Structure moléculaire de l'alginate.....	8
Figure I.9 : Interactions entre les unités M.....	9
Figure I.10 : Interactions entre unités G.....	9
Figure I.11 : Rheogramme contrainte de cisaillement-vitesse de cisaillement pour des solutions d'alginate de sodium à différentes concentrations.....	11
Figure I.12 : Gélification ionotropique de l'alginate modèle "egg-box"	11
Figure I.13 : Liaisons covalentes des ions calcium avec les résidus poly-G des polymères d'alginate	12
Figure I.14 : Rétention du calcium par un réseau tridimensionnel de segments poly-M ou poly-G définissant une structure de type "egg-box"	12
Figure I.15 : Oxydation du sodium alginate par le permanganate de potassium	16
Figure I.16 : Oxydation de l'alginate de sodium par le NaIO_4 et formation de Na-alginate oxydée sur la chaîne principale	17
Figure I.17 : Amination- Réductrice de l'alginate oxydé	18
Figure I.18 : Sulfatation d'alginate de sodium.....	19
Figure I.19 : Copolymérisation d'acrylate de sodium avec de l'alginate de sodium ...	19
Figure I.20 : Greffage de la cyclodextrine sur l'alginate	20

Figure I.21 Estérification de l'alginate en présence d'alcool.....	21
Figure I.22 : Alginate modifiée selon la réaction d'Ugi	21
Figure I.23 : Amidation d'alginate	22

CHAPITRE II : Partie expérimentale.

Figure II.3. Principe de fonctionnement de l'AFM	30
---	----

CHAPITRE III : Résultats et discussion.

Figure III.1 : Teneurs en groupements carbonyle en fonction de la concentration de Cl actif	34
Figure III.2 : Teneur en groupements carboxyles en fonction de la concentration de Cl actif	35
Figure III.3 : Teneur en groupements aldéhyde en fonction de la concentration de Cl actif	36
Figure III.4 : Variations de la conductivité électrique et du pH de l'alginate (1) et des alginates oxydés, OAlg1(2) et OAlg4 (3).....	37
Figure III.5 : Spectres IR-TF de l'alginate, OAlg1, OAl2, OAlg3 et OAlg4	40
Figure III.6 : Conversions les plus probables de l'alginate suite à son oxydation par l'hypochlorite de sodium	41
Figure III.7 : Spectres UV-Vis des films d'alginate et des alginates oxydés par le chlore actif à différentes concentrations	42
Figure III.8 : Diffractogrammes de l'alginate et des alginates oxydés par le chlore actif	43
Figure III.9 : Images par AFM des films des différents alginates étudiés	44
Figure III.10 : Variations des taux de gonflement (TG%) des différents films à T_{amb} en fonction du temps	46

PATRIE II : LA RÉACTION DE MAILLARD

CHAPITRE I : Généralités sur la réaction de Maillard

Figure I.1 : Etape initiale de la réaction de Maillard, du sucre et groupe amine au produit d'Amadori.....	52
Figure I.2 : Seconde étape de la réaction de MAILLARD, déshydratation modérée .	53
Figure I.3 : Seconde étape avancée de la réaction de MAILLARD, déshydratation forte.....	54
Figure I.4 : Seconde étape de la réaction de Maillard, dégradation de STRECKER ou décarboxylation oxydative et désamination des acides aminés	55
Figure I.5 : Synthèse de mélanoidines à partir de réductones et de résidus d'arginine	56
Figure I.6 : Réaction de rétroaldolisation.....	59

CHAPITRE II : Partie expérimentale.

Figure II.1 : Réaction de l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique avec les groupements amino libres de protéines en milieu alcalin	66
Figure II.2 . Courbe d'étalonnage à $\lambda_{\max}=652$ nm pour la détermination de protéines libérées à partir des films	68

CHAPITRE III : Résultats et discussion.

Figure III.1 : Evolutions des pHs en fonction du temps et de la température de la réaction	73
Figure III.2 : Intensités de brunissement en fonction de la température (A : T=70 ° C, B : T= 80 ° C et C : T= 90 ° C) et des pHs (de 7 à 11).....	74
Figure III.3 : Evolution de l'absorbance au cours du temps en fonction de la température (A : T=70°C, B : T= 80°C et C : T= 90°C).....	76
Figure III.4 : Taux de réticulation en fonction de pH et de la température.....	77
Figure III.5 : Gélatine libérée (%) en fonction du temps de stockage dans l'eau distillée, de la température et du pH (A : pH=7 ; B : pH=8 ; C : pH=9 ; D : pH=10. E : pH=11).....	79

Figure III.6 : Dosage pH-métrique de la gélatine et alginate-gélatine réticulés par la réaction de Maillard (A : T=70°C, B : T= 80°C et C : T= 90°C)	81
Figure III.7 : Structure moléculaire de l'alginate et équilibre entre les formes cycliques et les chaînes ouvertes dans l'acide α -L-gulonique et l'acide β -D-mannuronique	83
Figure III.8 : Spectre IR-TF de l'alginate, de la gelatine et des différents AG préparés (à T allant de 70°C à 90°C et aux pHs de 7 à 11).....	84
Figure III.9 : Représentation schématique des étapes impliquées dans la formation des conjugués principaux obtenus à partir du système alginate-gélatine au cours de la réaction de Maillard	86
Figure III.10 : Diffractogrammes des rayons X de (a) gélatine, (b) alginate, (c) AG70-11, (d) AG80-11 et (e) AG90-11	87
Figure III.11 . Thermogrammes TG des films à différentes températures 70°C, 80°C et 90°C et aux pH=11 (A), pH=7 (B)	88
Figure III.12 : AFM des différents films étudiés.....	89
Figure III.13 : Structures chimique du radical libre, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle, et de sa forme réduite.....	91
Figure III.14 : les IC ₅₀ de l'alginate, d'AG70-11, d'AG80-11, d'AG90-11 et du BHT	92
Figure III.15 : Absorbances des composés testés à $\lambda_{max} = 700$ nm en fonction de la concentration (mg/ml).....	94

LISTE DES TABLEAUX.

PARTIE I : OXYDATION DE L'ALGINATE DE SODIUM PAR L'HYPOCHLORITE DE SODIUM

Tableau II.1 : Codes donnés aux échantillons selon leurs compositions	26
Tableau III.1 :Teneurs en groupements carbonyle après oxydation de l'alginate par le NaOCl	34
Tableau III.2 :Teneurs en groupements carboxyle après oxydation de l'alginate par le NaOCl	35
Tableau III.3 : Teneurs en groupements aldehydes après oxydation de l'alginate par le NaOCl	36
Tableau III.4 : Valeurs des Gmax des différents matériaux étudiés à base d'alginate	46
Tableau III.5 . Potentiel hémolytique des alginates étudiés	47
Tableau III.6 : Effets anti-inflammatoires des matériaux étudiés <i>In-vitro</i> par la dénaturation de l'albumine de l'œuf	48
Tableau III.7 : Effets anti-inflammatoires de l'Ibuprofène et du Diclofénac de sodium <i>In-vitro</i> par la dénaturation de l'albumine de l'œuf	49
Tableau III.8 : Diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne (mm).....	50

PARTIE II : LA RÉACTION DE MAILLARD

Tableau II.1 : Codes utilisés pour les différents échantillons en fonction des conditions de préparation	65
Tableau III.1 : Activité anti-inflammatoire <i>in-vitro</i> d'AG70-11, AG80-11 et AG90-11.	96
Tableau III.2 : Activité anti-inflammatoire <i>in-vitro</i> des médicaments de référence.....	96
Tableau III.03 : Diamètres d'inhibition des croissances bactériennes (mm).	97

INTRODUCTION GÉNÉRALE.

Les polysaccharides sont des polymères naturels importants. Ils sont utilisés dans différents domaines, alimentaires et non alimentaires. Leur capacité d'augmenter la viscosité des solutions ou de former des gels et des films est un des paramètres majeurs de leur sollicitation dans diverses applications industrielles, exemple, dans les secteurs de l'emballage, textile, agriculture, pharmaceutique, électronique et biomédical.

Nous avons, alors, choisi un polysaccharide qui est l'alginate comme matrice de base dans la réalisation de notre thèse de Doctorat LMD. Il est encore appelé "les alginates". Ce dernier est un nom utilisé pour une famille de polysaccharides.

L'alginate possède de bonnes propriétés physicochimiques, mécaniques, biologiques..., mais son origine représente actuellement un domaine très attrayant pour les chercheurs et les industriels. Il est extrait à partir des algues brunes et des bactéries.

Il porte dans son ossature des fonctions organiques intéressantes. C'est un carrefour qui conduit le plus souvent à de nouveaux matériaux. Parmi ces fonctions chimiques, il existe des groupement carboxylates, des hydroxyles, des acétals et des hémiacétals. L'alginate est, en outre, doté de toutes les propriétés chimiques des carbohydrates. Les modifications chimiques répertoriées dans les travaux de recherche antérieurs sont les réactions d'oxydation, d'estérification, d'amidation...

En ce qui nous concerne, nous avons, toutefois, développé deux stratégies de recherche qui n'ont pas été abordées jusqu'à ce jour.

La première étude est consacrée à l'oxydation de l'alginate par un agent oxydant, l'hypochlorite de sodium. Cet agent est non sélectif. Il attaque la macromolécule d'une manière non spécifique et en plusieurs sites. Il convertie les alcools secondaires vicinaux ainsi que les carbones anomériques du cycle pyranose en carbonyles puis en carboxyles. Sans oublier de citer que d'autres

réactions secondaires sont susceptibles de survenir en présence de cet agent oxydant. Il entraîne dans des conditions non contrôlées des dégradations et notamment des dépolymérisations.

Pour ce qui est de la seconde stratégie de notre recherche. Nous nous sommes intéressés à la réaction de Maillard. Une réaction menée entre l'alginate et une protéine, la gélatine. Cette dernière est aussi très exploitée dans divers domaines, alimentaire, photographique, pharmaceutique et autres. Elle représente un des centres d'intérêt de notre laboratoire. Différentes thèses de Doctorat ont été développées autour de cette macromolécule comestible (**Bouras, 2012 ; Bazid, 2013 ; Chaibi, 2014 & Chetouani, 2015**).

Nous devons signaler que la réaction de Maillard en présence des macromolécules est peu exploitée dans la bibliographie. Elle représente un nouveau domaine de recherche intéressant surtout puisqu'il existe des controverses à propos des produits de cette réaction en tant qu'anticancéreux et antidiabétiques.

Cette réaction est également connue sous le nom de brunissement non enzymatique. Elle est la plus importante dans la chimie des aliments. Elle est présente dans de nombreux systèmes biochimiques, depuis les aliments jusqu'au cœur de nos cellules.

Elle est un ensemble de réactions très complexes. L'enchaînement de ces dernières, dans les systèmes alimentaires et biologiques, est commun pour les étapes initiales de ce type réaction. En revanche, la nature des composés formés varie. Les produits de cette réaction sont appelés MRPs, produits de la réaction de Maillard. La compréhension du mécanisme général de cette réaction remonte à environ un siècle, mais, nous découvrons régulièrement de nouveaux produits.

Cependant, comme il a été évoqué ci dessus, notre thèse de Doctorat s'articule en deux parties :

- Une partie sur l'oxydation de l'alginate par l'hypochlorite de sodium.

- Une partie sur la réaction de Maillard de l'alginate en présence de la gélatine.

Ces deux parties sont ensuite chacune scindée en trois chapitres. Les premiers chapitres des deux parties représentent des études bibliographiques. Celui de la partie I aborde les polysaccharides en général et de manière plus spécifique l'alginate alors que celui de la partie II, il passe en revue la réaction de Maillard. Les seconds chapitres sont consacrés aux parties expérimentales. Nous y trouvons une description détaillée des méthodes et des matériels utilisés.

Quant aux troisièmes chapitres, ils décrivent tous les résultats obtenus suivis d'interprétations en faisant appel à chaque fois à un support bibliographique qui nous a permis de comprendre et d'élucider les nouveaux phénomènes obtenus à partir des matériaux préparés.

PATRIE I :

***OXYDATION DE L'ALGINATE DE SODIUM PAR
L'HYPOCHLORITE DE SODIUM***

CHAPITRE I:

***ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES POLYSACCHARIDES
ET
L'ALGINATE***

Les biopolymères sont des biomacromolécules synthétisées par des organismes vivants. Selon l'ADEME (Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie), ce sont des polymères naturels issus de ressources renouvelables de plantes, d'algues ou d'animaux. Ils peuvent aussi être obtenus par polymérisation de monomères naturels et par la fermentation des micro-organismes (Mokrani, 2013).

I. Les polysaccharides

Les polysaccharides constituent la famille de biopolymères les plus répandus et les plus utilisés. Ils entrent dans la composition de la plupart des cellules (végétales, animales et microbiennes). Ils sont arbitrairement définis comme des polymères de haut poids moléculaire résultant de la condensation d'un grand nombre d'oses. Ces derniers ont été définis comme des aldéhydes ou des cétones polyhydroxylées. Ce sont des composés hydrosolubles et réducteurs comme le fructose. Chaque ose est lié à son voisin par l'intermédiaire d'une liaison osidique formée par élimination d'une molécule d'eau entre l'hydroxyle hémiacétalique en C₁ d'un ose et l'un quelconque des hydroxyles de l'autre molécule osidique (Figure I.1) (Mokrani, 2013).

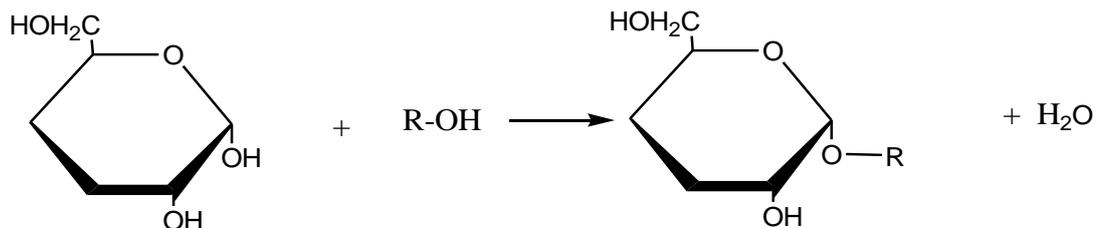


Figure I.1 : Exemple d'une liaison osidique.

Leurs propriétés rhéologiques (gélifiant, stabilisant, émulsifiant, épaississant,...) sont mises à profit dans l'agroalimentaire, l'industrie pétrolière, la cosmétique, les peintures, les adhésifs, les biomatériaux.... Leur bonne biocompatibilité confère à ces biomolécules de vastes possibilités d'utilisation dans l'industrie ; en général ; et plus spécialement, dans l'industrie chimique ainsi que dans l'industrie pharmaceutique et médicale. Un intérêt particulier est maintenant porté aux polysaccharides polyfonctionnels ayant une application indiscutable dans les domaines biomédicaux.

Par ailleurs, grâce à leurs propriétés régulatrices, les polysaccharides participent de l'activité cellulaire (prolifération, différenciation, adhésion et migration). Il n'est

donc pas étonnant que certains d'entre eux puissent interagir avec des systèmes biologiques (Delattre, 2005).

II. Types de polysaccharides

II.1 Polysaccharides cationiques

- Chitosane

Le chitosane est un biopolymère cationique produit commercialement par désacétylation de la chitine extraite de l'exosquelette des crustacés. Ce polymère présente de bonnes propriétés filmogènes et une activité inhibitrice de la croissance de plusieurs moisissures (Malek, 1999).

Le chitosane est un copolymère linéaire flexible de 2-acétamido-2-déoxy- β -D-glucopyranose et 2-amino-2-déoxy- β -D-glucopyranose liés en β (1-4). Cette macromolécule est obtenue par N déacétylation d'un des polymères naturels les plus abondants, la chitine, extraite des carapaces de crustacés tels que les crabes et les crevettes. La **figure I.2** représente le motif du chitosane (Payet, 2005).

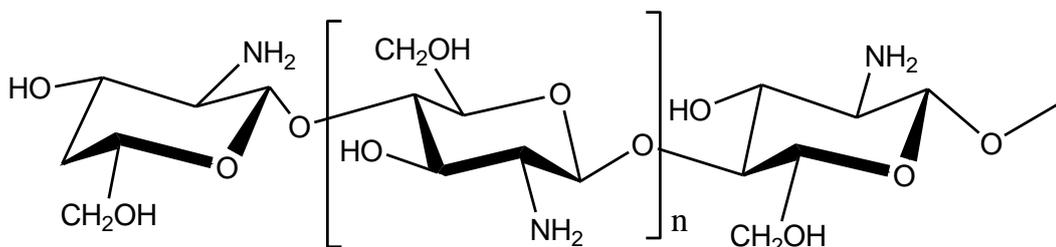


Figure I.2 : Représentation schématique d'une chaîne de chitosane (Payet, 2005).

II.2. Polysaccharides neutres

- Amidon

L'amidon est le composé glucidique bio-synthétisé et la principale source d'énergie pour l'homme et pour la vie animale. Il représente une fraction pondérale importante dans un grand nombre de matières premières agricoles telles que les céréales (30-80% de la matière sèche), les légumineuses (25-50% de la matière sèche) et les tubercules (60-90% de la matière sèche). Son faible prix fait de l'amidon un matériau économiquement intéressant. L'amidon est un mélange d'amylose, unités glucose unies par des liaisons α -(1 \rightarrow 4) (**Figure I.3**), linéaire et souvent en configuration hélicoïdale et d'amylopectine très ramifiée. Il contient une partie linéaire

formée d'unités glucose liées en α -(1 \rightarrow 4), mais également des ramifications faisant intervenir des liaisons α -(1 \rightarrow 6) toutes les 25 unités glucose en moyenne (**Figure I.4**) (**Mokrani, 2013**).

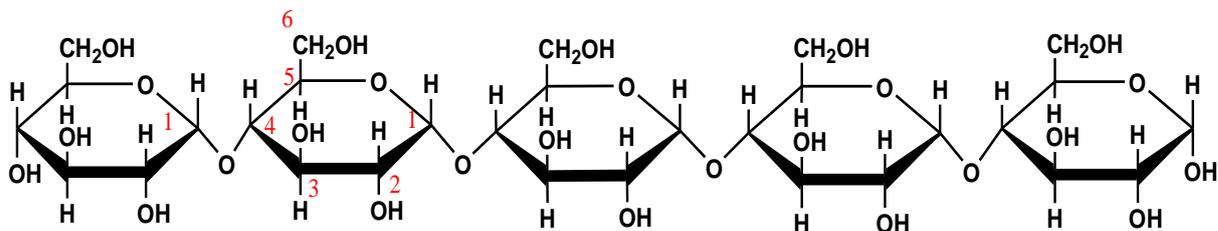


Figure I.3 : Structure chimique de l'amylose (**Çelebi et al., 2006**).

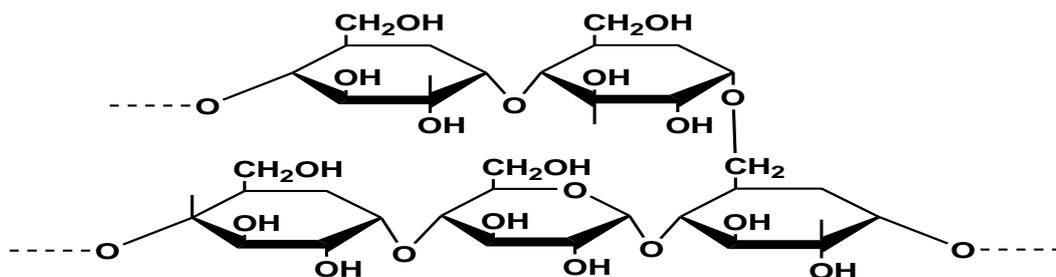


Figure I.4 : Structure chimique de l'amylopectine (**kara, 2010**).

L'amylose et l'amylopectine ne sont que deux des nombreux polysaccharides pouvant former des structures hélicoïdales. L'amylose est hydrosoluble dans l'eau bouillante alors que l'amylopectine ne l'est pas. La principale propriété lorsque l'amidon est conditionné sous forme de film est sa faible perméabilité et sa dégradation aisée en présence de micro-organismes. Un traitement chimique permet de rendre l'amidon résistant au cisaillement thermomécanique, car la stabilité de ce polymère sous contrainte n'est pas très élevée. À partir de 150°C, les liaisons glucosyle commencent à se rompre et à environ 250°C, les grains d'amidon collapsent endothermiquement. À faible température, un phénomène connu sous le nom de rétrogradation est observé pouvant conduire à la précipitation sous 10°C. Ce sont ces dernières caractéristiques qui sont utilisées pour la fabrication de films (**Jarroux, 2012**).

II.3. Polysaccharides anioniques

1. Acide hyaluronique ou hyaluronate

L'acide hyaluronique est un polysaccharide linéaire composé d'un enchaînement d'unités disaccharides composées d'acide glucuronique et de N-acétyl-glucosamine reliées par une liaison α -1,4 (**figure I.5**). C'est l'un des principaux composants de la matrice extracellulaire et du liquide synovial des articulations. L'immuno-neutralité de cet acide fait de lui un excellent matériau de construction des biomatériaux employés dans la médecine des tissus et dans les systèmes de libération des médicaments (**Onesippe, 2005**).

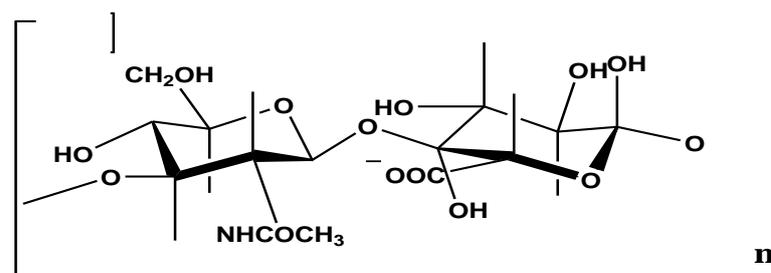


Figure I.5 : Structure chimique de l'acide hyaluronique (**Onesippe *et al.*, 2005**).

2. Alginate de sodium

L'alginate est un nom utilisé pour une famille de polysaccharides produit par les algues brunes et les bactéries (**Spencer *et al.*, 1965 & Govan *et al.*, 1981**). L'acide alginique a été découvert et extrait par Stanford en 1881 (**Donati *et al.*, 2009**).

Ce polysaccharide a été reconnu comme composant structural des algues brunes marines où il constitue jusqu'à 40% de la matière sèche. La présence de l'alginate dans les algues lui fournit la flexibilité ; de plus, il agit comme réservoir d'eau empêchant la déshydratation (**Donati *et al.*, 2009**).

Aujourd'hui, tous les alginates disponibles dans le commerce ont été extraits à partir du algue brune, principalement de *hyperborea de Laminaria*, *pyrifera de Macrocystis*, *digitata de Laminaria*, *Nodosum d'Ascophyllum*, *japonica de Laminaria* (**Figure I.6**) (**Donati *et al.*, 2009**).

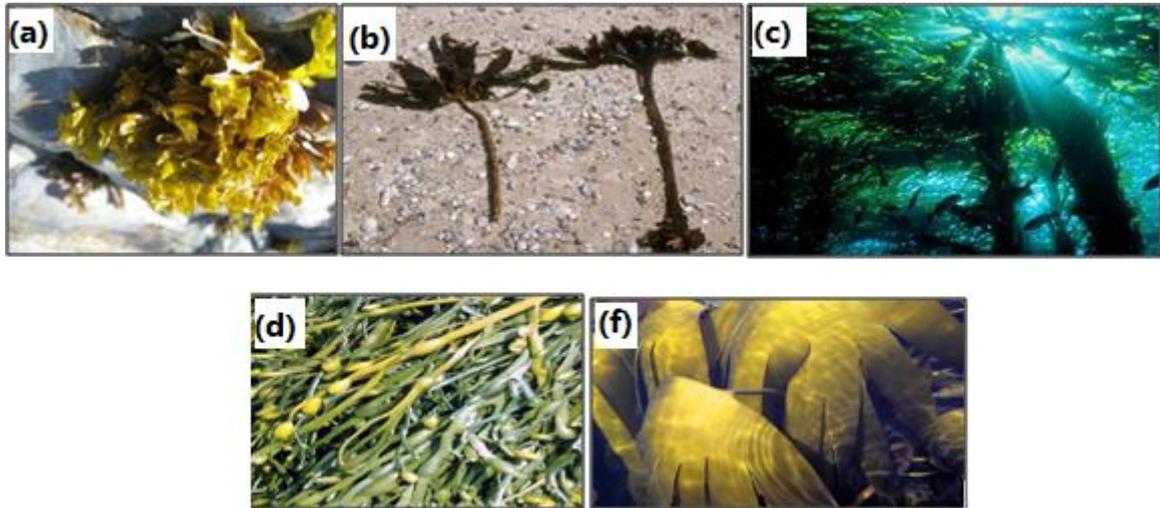


Figure I.6 : (a) *Japonica de Laminaria*, (b) *Hyperborea de Laminaria*, (c) *Pyrifera de Macrocystis*, (d) *Digitata de Laminaria*, (e) *Nodosum d'Ascophyllum* (**Donati et al., 2009**).

2.1. Composition de l'alginate

Les alginates sont les macromolécules naturelles composées de β -D-mannuronate et α -L-guluronate liés par des liaisons 1 \rightarrow 4 glycosidiques. Ils sont synthétisés par des bactéries et/ou algues brunes. Par contre, les résidus de mannuronate des bactéries sont acétylés (**Figure I.7**) (**Mirshafiey et al., 2009**).



Figure I.7 : Monomères composant la chaîne alginate (**Vincent, 2010**).

En effectuant une hydrolyse acide partielle de l'alginate, il est possible de séparer celui-ci en trois fractions caractéristiques (**Haug et al., 1966**).

- Deux d'entre elles contiennent quasi-exclusivement des ensembles d'homopolymères de motifs G et M respectivement.
- Une troisième possède des proportions presque égales des deux monomères sous la forme majoritaire de dimères MG.

Les alginates sont donc considérés comme de vrais copolymères à bloc composés de régions homopolymères de M (blocs MM) et G (blocs GG) séparées par des zones aux structures alternées (blocs MG) (**Donati *et al.*, 2009**).

La conformation des cycles monomères peut être déterminée par diffraction des rayons X. L'étude d'alginate riches en mannuronate et en guluronate a montré que les blocs guluronates ont une conformation chaise 1C_4 (les carbones 1 et 4 sont respectivement au-dessus et en dessous du plan moyen de la molécule) alors que les blocs mannuronates ont une conformation chaise 4C_1 (**Figure I.8**). De plus, les alginates possèdent les quatre types de liaisons glycosidiques possibles : diéquatoriales (MM), diaxiales (GG), équatoriale-axiale (MG) et axiale-équatoriale (GM) (**Draget *et al.*, 2005**).

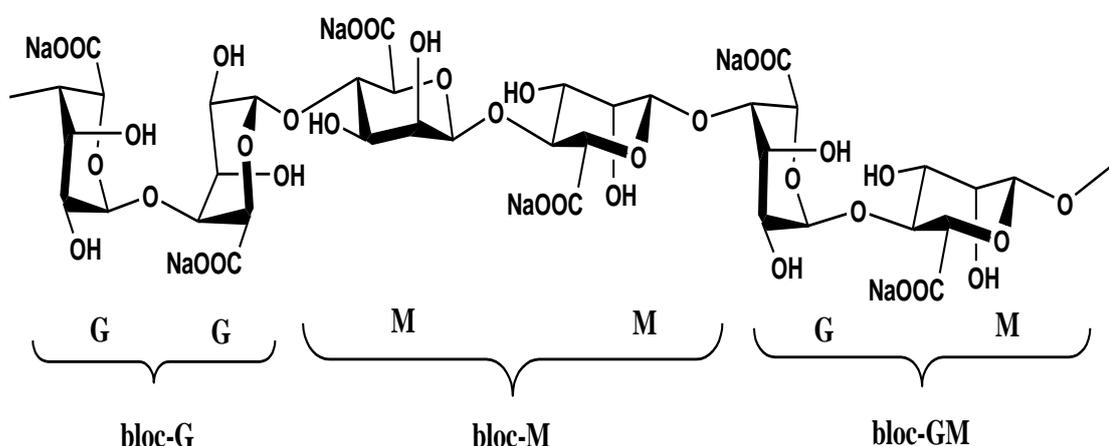


Figure I.8 : Structure moléculaire de l'alginate (**Salisu *et al.*, 2013**).

La structure des segments polyacide mannuronique est très proche de celle de la cellulose. Les liaisons diéquatoriales entre unités M donnent à ces segments une structure aplatie, de type ruban. Cette structure est stabilisée grâce à des liaisons Hydrogène. Par exemple, le groupement hydroxyle en C3 du monomère M+1 interagit avec l'atome d'oxygène du cycle du monomère M (**Figure I.9**) (**Palluault, 2010**).

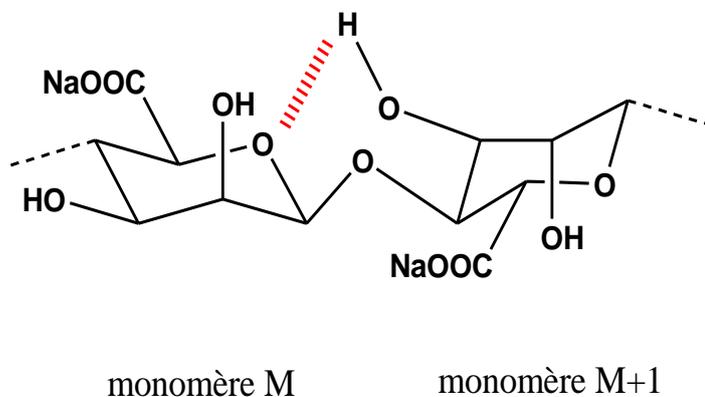


Figure I.9 : Interactions entre les unités M (Palluault, 2010).

La liaison diaxiale (GG) est très différente de la liaison (MM) car sa structure n'est pas plate et adopte l'arrangement plus rigide d'une boucle. Cette structure est aussi stabilisée par différentes liaisons hydrogène (Figure I.10). Par exemple, le groupement hydroxyle en C2 du monomère G et le groupement carboxyle du monomère G+1 interagissent par ce type de liaison (Mokrani, 2013).

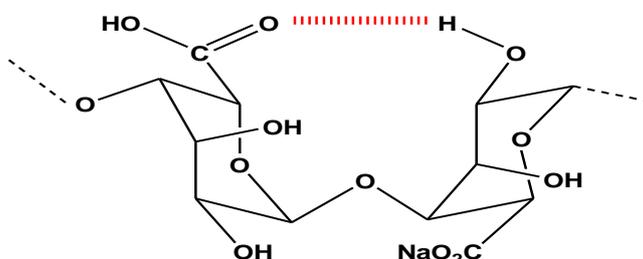


Figure I.10 : Interactions entre unités G (Mokrani, 2013).

Les blocs MG sont caractérisés par une alternance entre des liaisons axiales-équatoriales et des liaisons équatoriales-axiales. De telles variations dans la tacticité de la chaîne sont responsables d'une plus grande flexibilité des blocs MG comparés aux autres blocs.

D'ailleurs, les données de viscosité indiquent que la rigidité des blocs augmente dans l'ordre suivant: $MG < MM < GG$ (Palluault, 2010).

2.2. Propriétés physico-chimiques

A. Solubilité

L'alginate de sodium, comme tous les sels d'alginate monovalents, est soluble dans l'eau pour des valeurs de force ionique faibles. Lorsque la salinité du milieu

augmente, la solubilisation du polyanion est compromise. L'addition de sels tels que le chlorure de potassium va progressivement diminuer la solubilité de l'alginate dans l'eau jusqu'à la séparation de phases. Cela implique que la présence de sels dans l'eau peut avoir une forte influence sur la cinétique de solubilisation des alginates. Ceci est d'autant plus vrai dans le cas des ions di-ou multivalents qui vont non seulement augmenter la force ionique totale du système, mais aussi être capables de provoquer une agrégation à grande échelle des chaînes polymères (formation d'un réseau) pouvant aboutir la formation d'un hydrogel (**Donati et al., 2009**).

Le pH de la solution joue aussi un rôle dans la solubilisation des alginates. Si le pH de la solution contenant l'alginate est inférieure au pKa de l'acide mannuronique (pKa=3,38) ou de l'acide guluronique (pKa= 3,65), alors il peut y avoir séparation de phases voire formation d'un hydrogel (**Hang et al., 1967**). La sensibilité des alginates vis-à-vis du pH de la solution dépend non seulement de la masse molaire mais aussi de la composition chimique et de la séquence des blocs. Les alginates contenant plus de sections alternées (blocs MG) précipiteront à des valeurs de pH plus faibles que les alginates contenant plus de blocs homogènes (poly-M et poly-G) (**Palluault, 2010**).

B. Comportement rhéologique

Les alginates ont en général un comportement quasi-Newtonien, même si des déviations peuvent être observées suivant plusieurs facteurs, notamment le type d'alginate, la concentration de la solution, la composition chimique de l'alginate, sa masse moléculaire moyenne, etc. La **figure I.11** présente un exemple de Rheogramme obtenu en 2006 pour des solutions d'alginate de sodium à différentes concentrations. On constate une dépendance linéaire dans tous les cas, traduisant un comportement Newtonien, excepté pour la concentration la plus élevée, pour laquelle on peut observer une légère déviation (**Carturan et al., 2006**).

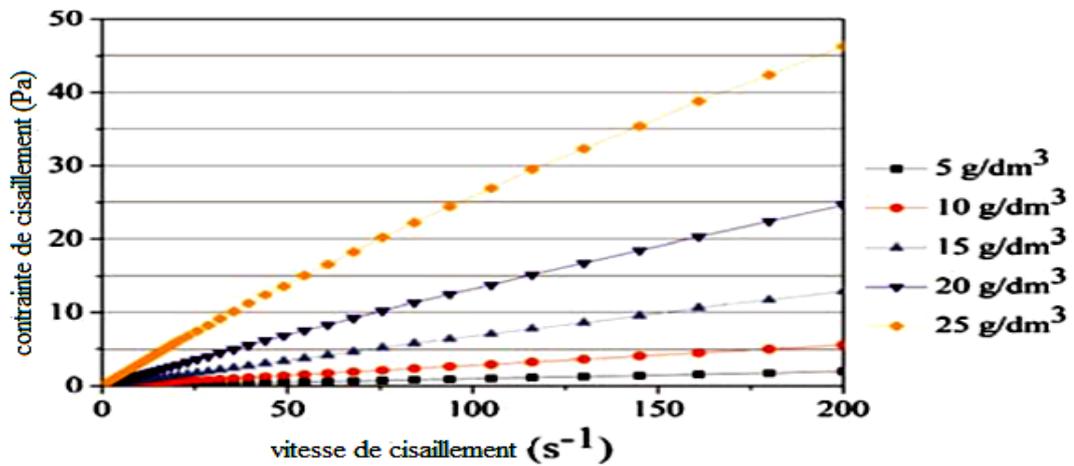


Figure I.11 : Rheogramme contrainte de cisaillement-vitesse de cisaillement pour des solutions d'alginate de sodium à différentes concentrations (Carturan *et al.*, 2006).

C. Gélification

Les propriétés physiques de l'alginate sont décrites pour la première fois dans les années 1970. La principale caractéristique de l'alginate est sa capacité à gélifier en présence de cations multivalents. Cette transition sol/gel n'est pas influencée par la température (Mokrani, 2013).

Les sels d'alginate sont solubles dans l'eau et sont capables de gélifier en présence de cations multivalents tels que les ions Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} ou encore Al^{3+} grâce à la formation d'une jonction impliquant plusieurs chaînes polysaccharidiques. Cette interaction est décrite par le modèle « egg-box » dans lequel chaque ion divalent peut interagir avec deux résidus G adjacents ou appartenant à deux chaînes opposées (Figure I.12) (Gregor *et al.*, 1973).

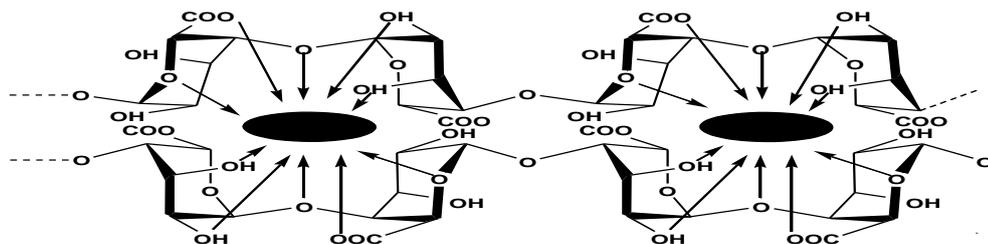


Figure I.12 : Gélification ionotropique de l'alginate modèle "egg-box" (Mjahed, 2009).

Aussi, des travaux menés par **Smidsrod (1965)** ont montré que l'ion chélateur divalent impliqué dans les liaisons intra et intermoléculaire de l'alginate possède une affinité variable avec les résidus G suivant le type de cation considéré, à savoir: $Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn > Mn$ (**Smidsrod, 1965**).

Le sel de cation divalent généralement utilisé pour la gélification de l'alginate est le chlorure de calcium en raison de sa bonne solubilité en milieu aqueux et de la forte disponibilité en ions calcium qu'il apporte. Il a été montré que 90% des ions sodium contenus dans une solution d'alginate de sodium peuvent être facilement déplacés par les ions calciques (**Seely *et al.*, 1974**).

Les ions calcium s'associent préférentiellement aux fragments poly-guluronate plutôt qu'aux fragments poly-mannuronate (**Figure II.13**). En effet, les blocs poly-guluronate, en raison de leur conformation spatiale, permettent une chélation plus énergétique des ions. Ces derniers sont retenus dans une « cage » et interagissent avec les fonctions carboxylates et les atomes d'oxygène des fonctions hydroxyles. Les ions calcium sont beaucoup mieux retenus par de simples liaisons ioniques (**Draget *et al.*, 2005**).

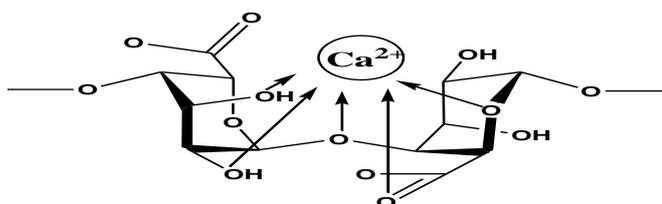


Figure I.13 : Liaisons covalentes des ions calcium avec les résidus poly-G des polymères d'alginate (**Draget *et al.*, 2005**).

Cet enchaînement régulier de type « egg box » (**Figure I.14**) se reproduit périodiquement : il se forme un réseau tridimensionnel à zones organisées reliées par les segments poly-M ou poly-(M-G) (**Vincent, 2010**).

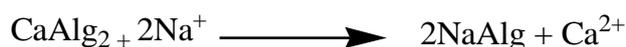


Figure I.14 : Rétention du calcium par un réseau tridimensionnel de segments poly-M ou poly-G définissant une structure de type "egg-box" (**Vincent, 2010**).

La structure du polymère est donc l'élément déterminant du comportement rhéologique des gels d'acide alginique : la proportion des blocs poly-G et leur longueur conditionnent la formation et la force des gels obtenus en présence de calcium (**Vincent, 2010**).

2.3 Procédés d'extraction

À partir des algues brunes, les alginates sont présents sous forme de sels insolubles (principalement de calcium). Le principe de l'extraction est de convertir ces sels insolubles en sels de sodium soluble. L'algue pourrait être traitée par une solution alcaline, le processus étant alors un échange d'ions (**Manev, 2013**).



Cependant, de nombreux auteurs ont montré qu'un prétraitement avec un acide minéral permet d'améliorer l'extraction (**Hern *et al.*, 1999**).



En industrie, il existe deux protocoles classiquement utilisés pour extraire les alginates, la méthode dite directe et la méthode dite indirecte. Elles reprennent toutes les deux le principe du prétraitement acide suivi d'une extraction alcaline. C'est le mode de précipitation utilisé ensuite qui différencie la méthode directe de la méthode indirecte. Le choix de l'une ou l'autre est lié à l'espèce d'algue traitée (**Manev, 2013**).

➤ Préparation de la matière première :

Il existe différents modes de conservation des algues fraîches : le formol, la congélation, le séchage. C'est généralement le formol qui est utilisé, car il présente plusieurs avantages : il est peu coûteux, il provoque une dépigmentation des algues (amélioration de la blancheur du produit final) et une libération des phénols. Les algues sont plongées dans un bain de formol à environ 1% puis stockées. Avant utilisation, les algues sont rincées, puis découpées en fragments de 20 à 30 cm de longueur pour faciliter le transport par pompage. Si les thalles ont été conservés sèches, il faut les réhydrater (**Vauchel, 2007**).

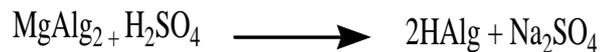
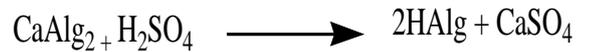
➤ Formation de l'alginate de sodium :

L'alginate se trouve dans les cellules de l'algue sous forme de sels de sodium, calcium et magnésium. Les alginates de calcium et magnésium sont insolubles. Les

étapes de lixiviation et de carbonatation décrites ci-après permettent de les transformer en sel de sodium soluble dans l'eau (**Perez et al., 1992**).

➤ **Lixiviation ou acidification :**

Les algues sont immergées dans une solution d'acide sulfurique à environ 0,5N pendant plusieurs heures. Les sels d'alginate insolubles situés dans les cellules de l'algue passent sous forme d'acide alginique insoluble et les ions calcium, sodium et magnésium sont libérés sous forme de sulfates avec les eaux de rinçage. Deux à trois rinçages à l'eau douce sont nécessaires (**Vauchel, 2007**).



➤ **Carbonatation :**

Les algues sont immergées dans une solution de carbonate de sodium à environ 4 %. L'acide alginique insoluble présent dans les cellules de l'algue réagit avec le carbonate de sodium pour donner de l'alginate de sodium soluble, qui passe en phase aqueuse. Au terme de cette opération, on obtient un jus de carbonatation : la matière algale est décomposée sous forme de particules en suspension dans la solution d'alginate de sodium (**Mokrani, 2013**).

Suivant l'espèce d'algue traitée et la gamme de viscosité que l'on désire obtenir pour le produit final, on peut faire varier la température et le temps de contact. Pour *digitata de Laminariale*, on préfère opérer à froid ou à 25-30°C de façon à préserver une haute viscosité (**Vauchel, 2007**).

➤ **Flottation et filtration :**

Il s'agit de séparer la solution d'alginate de sodium des particules de matière algale en suspension. Théoriquement, la séparation pourrait se faire par simple filtration. En fait, les particules de cellulose contenue dans la matière algale en suspension et autres composés insolubles sont si fins et si mucilagineux qu'ils colmatent rapidement les filtres. Dans l'industrie, on utilise le plus couramment l'émulsifiations (injection d'air dans le jus de carbonatation dilué) puis la flottation. En laboratoire, on utilise le plus souvent la centrifugation (**Perez et al., 1992**).

➤ **Précipitation de l'acide alginique :**

L'acide alginique est précipité par ajout d'acide sulfurique à la solution d'alginate de sodium, de façon à ce que le pH soit inférieur à 2. Le carbonate de sodium reste en excès dans la solution se décompose en libérant du gaz carbonique. Ce dernier se prend dans les fibres d'acide alginique en formation et les amène à la surface. Il se forme une mousse d'acide alginique, qui s'épaissit et se tasse progressivement (**Vauchel, 2007**).

➤ **Déshydratation :**

Dans l'industrie, des systèmes de filtre-presse ou de presse à vis sont utilisés, parfois associés à de l'alcool, pour déshydrater la mousse d'acide alginique. À la sortie de la presse, on obtient un acide alginique à environ 30% d'humidité. Ce produit est ensuite traité avec les bases adéquates pour produire les différents sels d'alginate qui sont commercialisés : (**Vauchel, 2007**)

- l'acide alginique (E400) ;
- l'alginate de sodium (E401) ;
- l'alginate de potassium (E402) ;
- l'alginate de calcium (E403) ;
- l'alginate d'ammonium (E404) ;
- l'alginate propylène glycol (E405) ;
- l'alginate de triéthanolamine.

2.4 Modifications chimiques de l'alginate de sodium :

2.4.1. Modifications chimiques des groupes d'hydroxyles :

1. Oxydation :

✓ Oxydation par le permanganate de potassium :

L'alginate de sodium peut être partiellement oxydé avec KMnO_4 en milieu acide. L'oxydation de l'alginate de sodium conduit à un clivage diols vicinaux en deux groupes aldéhyde (**Figure I.15**). Le degré d'oxydation peut être contrôlé par le pH et la quantité de KMnO_4 . Le permanganate de potassium (KMnO_4) est un agent oxydant puissant et pas cher. Après oxydation, le poids moléculaire de l'alginate se réduit et sa vitesse de dégradation dépend du degré d'oxydation (**Lu et al. 2009**). Ce dernier a été suivi par la diminution de la viscosité et la masse moléculaire. Ce type d'oxydation

fournit une méthode pour obtenir l'alginate partiellement oxydé et pour améliorer ses propriétés pour des applications biomédicales.

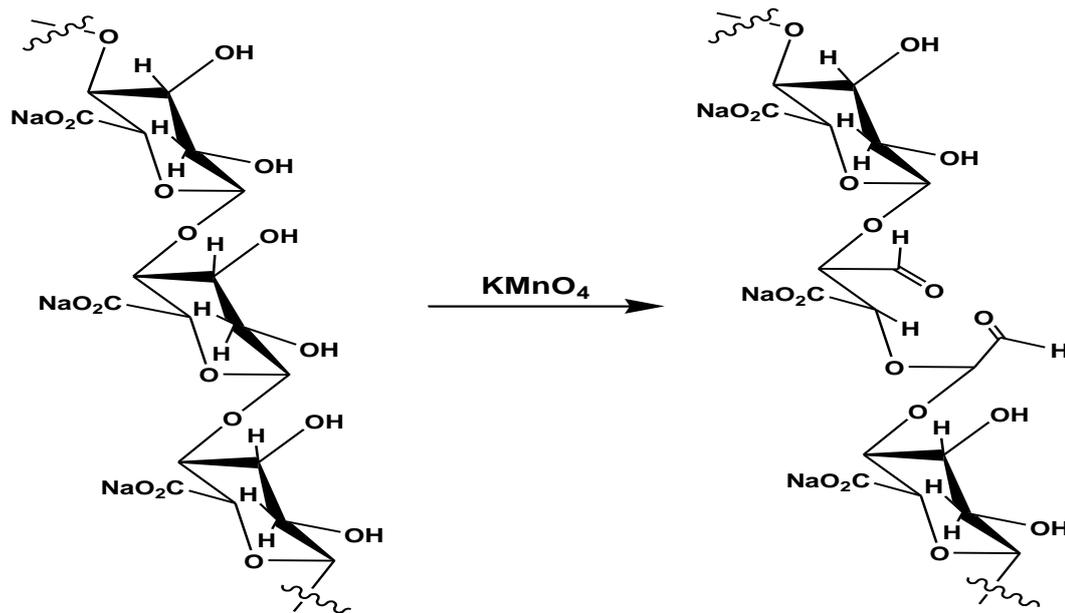


Figure I.15 : Oxydation du sodium alginate par le permanganate de potassium (Lingbin *et al.*, 2009).

✓ **Oxydation par le periodate :**

L'oxydation de l'alginate suscite beaucoup d'attention parce que les alginates oxydés présentent des groupes plus réactifs et une dégradation plus rapide quand ceux-ci sont employés dans des supports dans la libération contrôlée des médicaments (Boontheekul *et al.*, 2005).

Les réactions d'oxydation des groupes OH en positions C-2 et C-3 des unités uroniques de l'alginate de sodium sont exécutées avec le periodate de sodium (**Figure I.16**), qui mène, par la rupture du lien carbone-carbone, à la formation de deux groupes aldéhyde dans chaque unité monomérique oxydée. Par conséquent, une plus grande liberté de rotation et de nouveaux groupes réactifs le long de la chaîne sont obtenus. L'exclusion de la lumière pendant l'oxydation est essentielle pour la limitation des réactions secondaires. Il est possible de contrôler le degré d'oxydation d'alginate en changeant la concentration de l'oxydant (Yang *et al.*, 2011). Une réduction significative de la viscosité est enregistrée en raison de la dégradation du poids moléculaire et de l'extension de la conformation de la chaîne par ouverture de cycle. L'oxydation partielle des alginates peut être avantageuse pour des applications

biomédicales car ils se dégradent en milieu aqueux, tandis que les alginates non modifiés ne le sont pas (Pawar *et al.*, 2012).

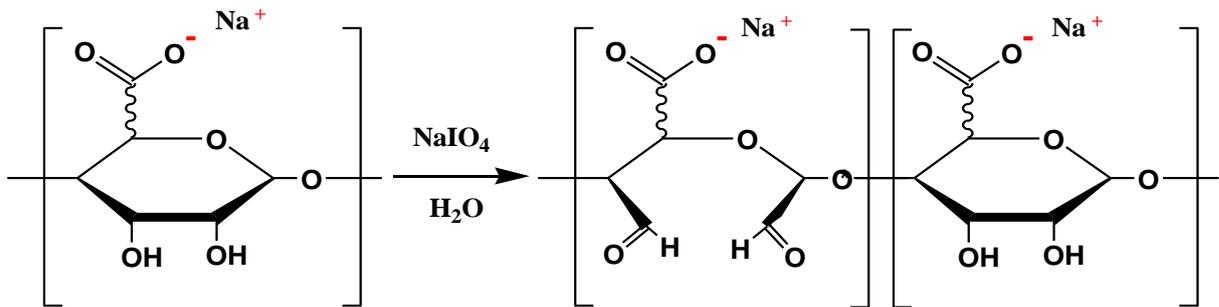


Figure I.16 : Oxydation de l’alginate de sodium par le NaIO_4 et formation de Na-alginate oxydée sur la chaîne principale (Gomez *et al.*, 2007).

✓ Oxydation avec le H_2O_2 :

Les réactions d'oxydation de la solution d'alginate avec le H_2O_2 ont été effectuées dans des conditions différentes pour préparer l’alginate à faible poids moléculaire et son application potentielle pour la technologie tissulaire a été prouvée. L’oxydation par le H_2O_2 permet selon des conditions opératoires de temps, de température, de pH, de concentration en H_2O_2 déterminées dans la bibliographie, une dépolymérisation de l’alginate (Xiaxia *et al.*, 2010).

2. Amination réductrice de l'alginate oxydé :

La réaction d'amination réductrice est une réaction qui se déroule *à priori* entre les amines (primaires, secondaires, tertiaires) et des composés carbonyles (Carré *et al.*, 1991).

L’oxydation de l’alginate donne des groupements réactifs susceptibles de réagir avec d’autres entités organiques permettant d’obtenir de nouveaux matériaux. Après oxydation, l’aldéhyde formé à partir des groupements hydroxyles se condense avec les amines alkyles *via* la base de Schiff appelé aussi fonction imine qui est instable. Cette dernière est soumise ensuite à une réduction, nous avons alors à faire à une amination réductrice. L’agent réducteur de l’imine le plus utilisé est le NaCNBH_3 . Il est plus réactif et sélectif que l’hydroborate de sodium (NaBH_4) fréquemment utilisé (Andresen *et al.*, 1977).

Aussi, il est avantageux d'utiliser le NaCNBH_3 comme agent réducteur car la réduction des groupements intermédiaires imines (base de Schiff) par l'anion CNBH_3^- est rapide à des valeurs de pH de 6-7. Par contre, cette réduction des aldéhydes ou des cétones est négligeable dans cette gamme (**Figure I.17**) (**Kang et al., 2002, Yang et al., 2011**).

Kang et al., (2002) ont préparé de nouveaux polymères dérivés d'alginate en passant par ce type d'animation. L'ibuprofène a été inclus dans cet alginate modifié pour le contrôle de la libération *in vitro*. Il a été constaté que le taux d'inclusion du médicament a été évidemment augmenté et la vitesse de la libération a été bien contrôlée.

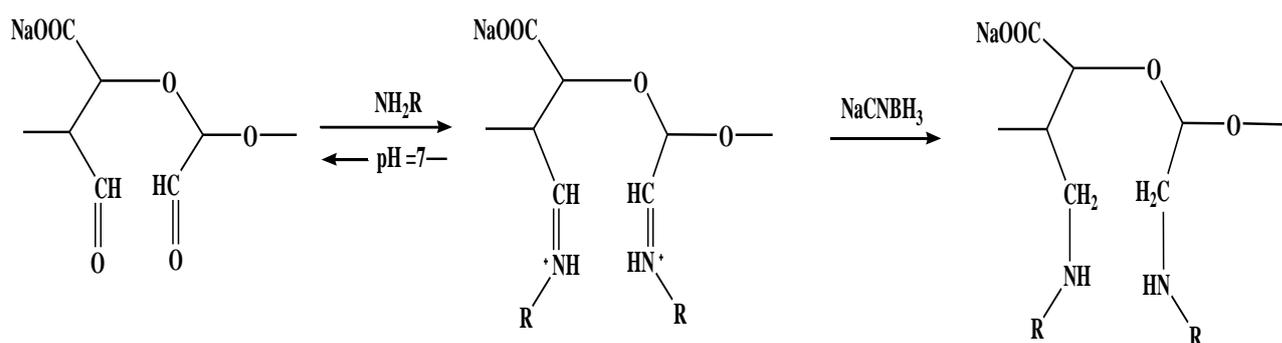


Figure I.17 : Amination- Réductrice de l'alginate oxydé (**Yang et al., 2007**).

3. Sulfatation :

Quand l'alginate est sulfaté, il montrera une compatibilité élevée avec le sang parce que il a une similitude structurale avec l'héparine (une molécule constitué principalement d'oses et qui fait partie des matrices extracellulaires des tissus conjonctifs), qui a été largement répandue dans la thérapie d'anticoagulant pendant plus de 60 années (**Alban et al., 2002**). Les sulfates d'alginate ont été préparés à partir de l'alginate de sodium par une réaction avec ClSO_3H dans le formamide (**Figure I.18**). Les essais *in vitro* sur la coagulation du plasma humain contenant des sulfates d'alginate ont indiqué que ces derniers ont une activité anticoagulante très élevée en particulier dans la voie intrinsèque de la coagulation (**Ronghua et al., 2003**).

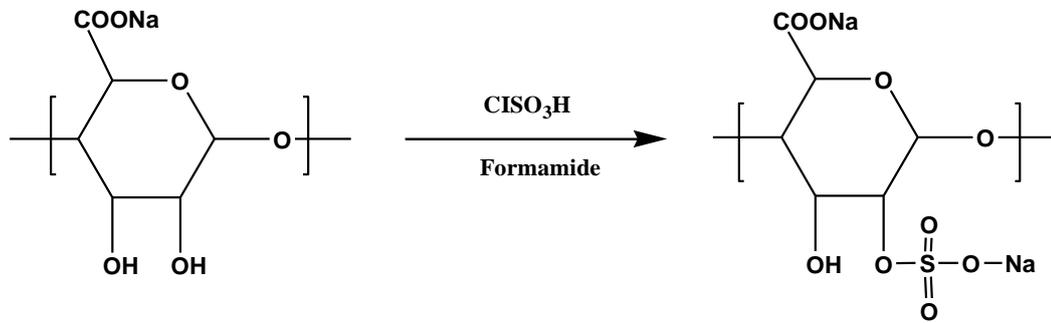


Figure I.18 : Sulfatation d'alginate de sodium (Pawar *et al.*, 2012).

4. Copolymérisation :

La copolymérisation est une condensation simultanée de deux composés organiques ou plus, suivie d'une polymérisation, qui fournit une macromolécule appelée généralement un copolymère (Liu *et al.*, 2002).

La copolymérisation de l'acrylate de sodium avec l'alginate de sodium forme un absorbant résistant dans les solutions salines (Figure I.19). Cette étude a prouvé que si l'absorbant préparé est laissé gonfler dans une solution aqueuse de NaCl (0,9 % w/v) à température ambiante pendant 30 minutes, la capacité d'absorption de l'eau par l'absorbant est d'environ 85 à 1000 fois sa propre masse. Pendant ce temps, cet absorbant obtenu a également une excellente capacité de former un hydrogel (Liu *et al.*, 2002). En outre, la réaction de greffage peut avoir lieu au niveau des groupes hydroxyles. La synthèse de diverses catégories des copolymères basés sur l'alginate de sodium greffés par l'acrylamide a été rapportée par Sen *et al.*, (2010). Cette expérience a montré que le copolymère ayant le pourcentage de greffage le plus élevé et le poids moléculaire le plus grand est un meilleur agent flocculant pour une suspension de charbon (Sen *et al.*, 2010).

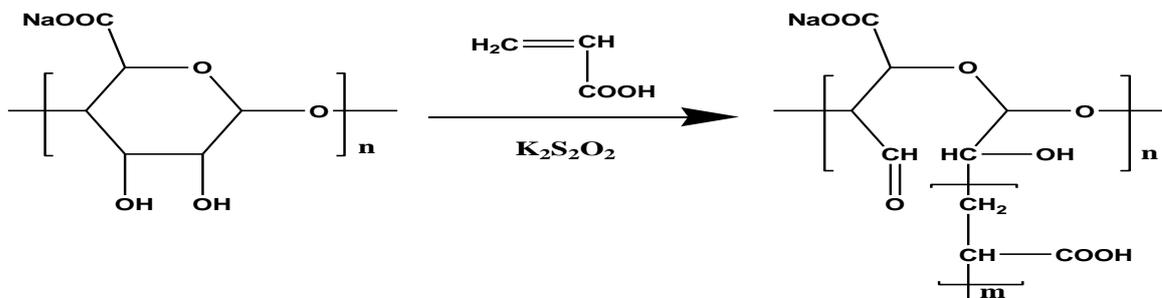


Figure I.19 : Copolymérisation d'acrylate de sodium avec de l'alginate de sodium (Yang *et al.*, 2007).

5. Cyclodextrine-alginate liés :

Pluemsab *et al.*, (2007) ont prouvé que les capacités d'inclusion dans l'alginate ont été présentées en liant en covalence les α -cyclodextrines (α -CD). La réaction de couplage (**Figure I.20**) entre la α -CD et l'alginate a été faite par conversion des groupes hydroxyles d'alginate par l'intermédiaire NCB_r pour ne pas affecter les groupes carboxyliques et qui était nécessaire pour former les sphères d'alginate de calcium. Cette synthèse est aussi applicable dans le domaine d'encapsulation bactérienne.

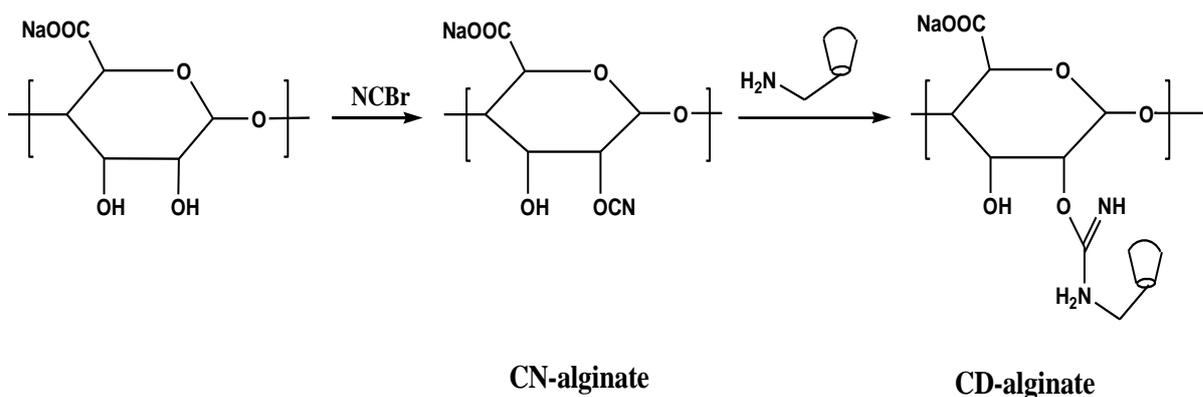


Figure I.20 : Greffage de la cyclodextrine sur l'alginate (**Yang *et al.*, 2007**).

2.4.2 Modifications chimiques des groupes carboxyliques

1. Estérification

L'estérification est souvent utilisée comme méthode simple par laquelle des groupes alkyles sont attachés aux molécules. Cette méthode a été avec succès employée par des chercheurs pour modifier l'alginate en augmentant son hydrophobicité par l'addition des groupes alkyles (**Leonard *et al.*, 2004, Pelletier *et al.*, 2001**).

L'alginate peut être modifié par estérification directe avec plusieurs alcools en présence d'un catalyseur. L'alcool doit être en excès dans le mélange réactionnel pour assurer la formation du produit désiré (**Figure I.21**). Pendant les dernières années, parmi les dérivés estérifiés de l'alginate le seul dérivé ayant une valeur commerciale est l'ester d'alginate (PGA) qui a été obtenu par estérification d'alginate avec le propylèneoxyde (**Carré *et al.*, 1991**).

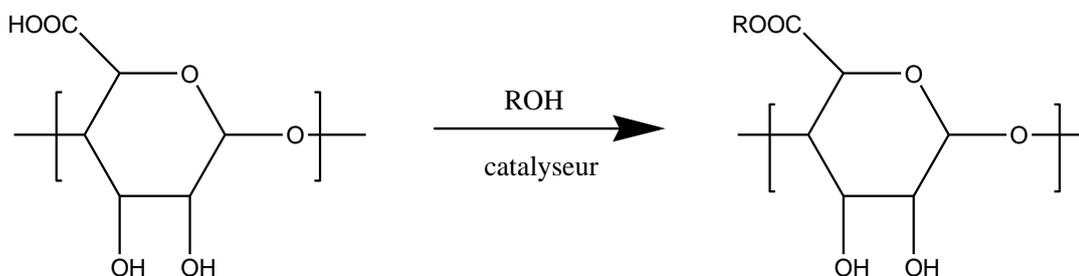


Figure I.21 Estérification de l'alginate en présence d'alcool (Yang *et al.*, 2007).

2. Réaction d'Ugi :

La réaction d'Ugi est une réaction chimique qui met en jeu quatre composants (un aldéhyde, une amine, un isocyanide et un acide carboxylique) pour former une bis-amide.

La diversité et la complexité moléculaire accessible par la réaction d'Ugi ont fait un outil très apprécié par les chimistes médicaux pour la découverte de nouvelles molécules biologiquement actives.

La réaction d'Ugi a également été exploitée dans différents procédés industriels. Ainsi cette dernière a été utilisée comme étape clé pour accéder rapidement au (R)-N-*tert*-butyl-pipérazine-2-carboxamide, un intermédiaire de synthèse dans la préparation du Crixivan, préconisé dans le traitement du SIDA. L'alginate modifié selon cette réaction a été obtenu après la condensation de divers composants donnés dans la figure I.22 (Bu *et al.*, 2006).

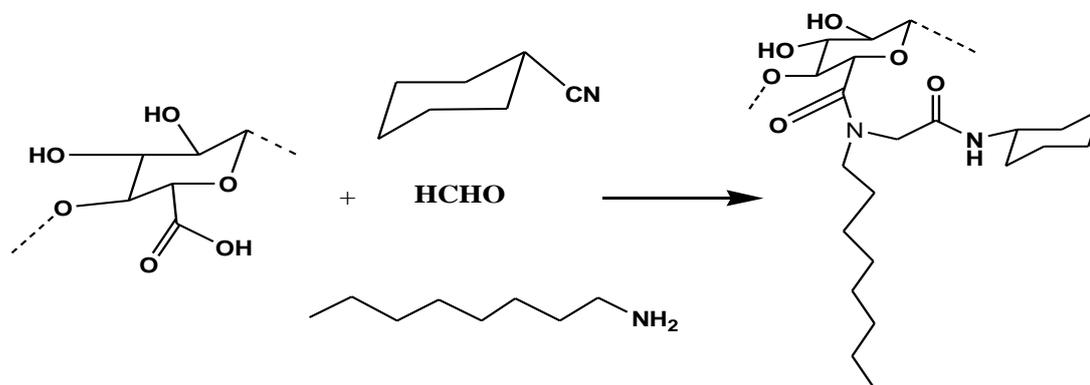


Figure I.22 : Alginate modifiée selon la réaction d'Ugi (Yang *et al.*, 2007).

3. Amidation

Une amidation exige la présence d'acides carboxyliques et d'amines libres. Cette réaction fournit des rendements élevés en produits de type amide dans des conditions

douces de courtes durées et à température ambiante (Yang *et al.*, 2007).

L'alginate a été modifié par le chlorhydrate du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) pour former des groupements amide sur les carboxylate de l'alginate (Figure I.23) (Galant *et al.*, 2006).

La préparation des dérivés d'alginate portants des groupements amide a été également rapportée dans les littératures (Yang *et al.*, 2002, Zhu *et al.*, 2002, Polyak *et al.*, 2004).

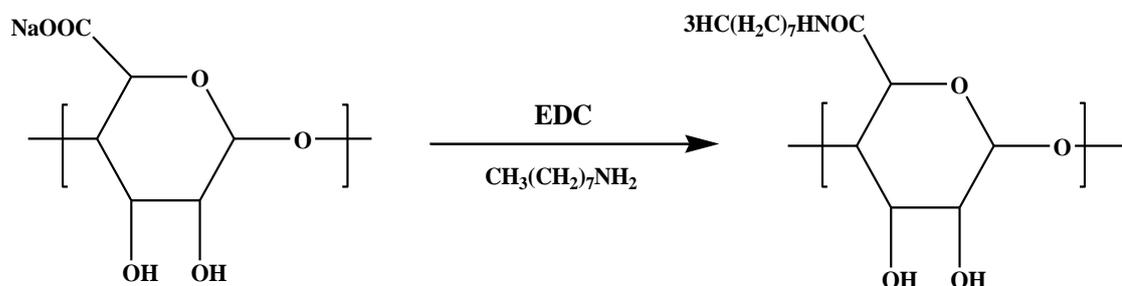


Figure I.23 : Amidation d'alginate (Yang *et al.*, 2007).

2.5. Applications industrielles

L'alginate produit à grande échelle trouve des applications principalement dans le domaine de l'alimentation, pour laquelle environ la moitié de la production y est transformée. Ses propriétés colloïdales uniques font qu'il peut être utilisé en tant qu'épaississant, stabilisant, agent filmogène, gélifiant, etc. Les 24300 tonnes d'acide alginique extraites dans le monde sont employées dans : (Perez *et al.*, 1992)

- **L'industrie textile** : 50% de la production mondiale de l'alginate est utilisé dans cette industrie. L'alginate peut être utilisé comme :
 - Epaississant pour les pâtes d'impression.
 - Epaississant et stabilisateur des teintures.
 - Agent d'imperméabilisation.
 - Agent plastifiant et filmogène.
- **L'industrie agroalimentaire** : 30% de la production mondiale de l'alginate est utilisé dans cette industrie. L'alginate peut être utilisé comme :
 - Epaississant, texturant, conservateur dans de nombreux produits : confitures, jus de fruits, sauces (moutarde, mayonnaise), potages, produits laitiers.
 - Stabilisateur dans les crèmes glacées (empêche la formation de cristaux).

- **L'industrie du papier** : 5% de la production mondiale de l'alginate est utilisé dans cette industrie. L'alginate peut être utilisé comme :
 - Agglomérant pour les fibres.
 - Apprêt de surface.
 - Epaississant et stabilisant dans les colles.
 - Dans le maintien des pigments en suspension.
- **L'industrie pharmaceutique** : 5% de la production mondiale de l'alginate est utilisé dans cette industrie. L'alginate peut être utilisé comme :
 - Stabilisateur d'émulsions.
 - Agglomérant dans les comprimés.
 - Epaississant et hémostatique dans les pommades, pansements, mèches nasales.
 - Gélifiant dans les pâtes à empreinte dentaire.
- **Divers** : 9% de la production mondiale de l'alginate est utilisé dans d'autres domaines comme :
 - Epaississant dans les produits de beauté et pâtes à dentifrice.
 - Stabilisateur pour les peintures et vernis.
 - Flocculant en traitement des eaux.
 - Agglomérant pour les électrodes de soudure.
 - Agent absorbant dans les couches pour bébé.

CHAPITRE II :
PARTIE EXPÉRIMENTALE.

I. Produits utilisés

Alginate de sodium $pK_a=3,38$, MM de l'unité répétitive = 198,1 g/mol, PM=12–40 kDa, (Sigma-Aldrich); Le radical 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH·) ($C_{18}H_{12}N_5O_6$), MM=394,32g/mol (Sigma-Aldrich); le chlorhydrate d'hydroxylamine (NH_2OH), MM=69.49 g/mol, (Sigma-Aldrich); l'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 12°. Tous les autres produits chimiques utilisés lors de la réalisation de nos études sont de grade analytique.

II. Méthodes

II.1 Préparation des films d'alginate et d'alginate oxydés

Dans un bécher de 100 mL, on mélange à 17% soit 17 g de poudre d'alginate de sodium dans 83 mL d'eau distillée à $T=35\text{ C}^\circ$ sous agitation manuelle à l'aide d'une baguette en verre. Le pH est ajusté à 9,5 avec le NaOH (1N). Une masse de 0,85 g d'hypochlorite de sodium est ajoutée lentement dans le bécher pendant 30 min. Le pH doit être ajusté à 9,5 avec NaOH (1N). Après addition de NaOCl, le pH du mélange est toujours maintenu à 9,5 par le NaOH (1N) pendant 50 min. Le mélange est ensuite neutralisé à un $pH=7$ avec H_2SO_4 (1N). Puis, il est isolé par centrifugation, lavé avec de l'eau distillée et enfin, séché à l'étuve à $40^\circ C$ pendant 24 h. La même procédure est reprise pour les différentes concentrations de chlore actif (0,75 ; 1,5 et 3,0% en poids/poids).

Pour préparer des solutions d'hypochlorite de sodium avec des pourcentages de chlore actif de 0,25 ; 0,75 ; 1,5 et 3%, nous avons procédé à des dilutions respectives jusqu'à 1000 mL dans de l'eau distillée de 65,78 mL ; 197,23 mL ; 395,25 mL ; 793,65 mL de NaOCl (12°). Les échantillons résultants sont codés comme il est illustré dans le **tableau II.1** :

Tableau II.1 : Codes donnés aux échantillons selon leurs compositions.

% du chlore actif utilisé	0	0,25	1,5	0,75	3
code	Alg	OAlg1	OAlg2	OAlg3	OAlg4

II.2 Dosage chimique

II.2.1 Détermination de la teneur en carbonyle

La teneur en carbonyle est déterminée en suivant la méthode titrimétrique de **Kuakpetoon *et al.*, (2001)**. Dans un bécher de 100 mL, 1 g d'alginate de sodium oxydé par le chlore actif est mis en suspension dans 25 mL d'eau distillée. La suspension est laissée gélifier dans un bain d'eau bouillante pendant 20 min. Ensuite, la température est ramenée à 40°C et le pH à 3,2 avec HCl (0,1 N). Puis, 3,75 mL du chlorhydrate d'hydroxylamine sont ajoutés. Le bécher est fermé et placé dans un bain d'eau à T=40°C pendant 4 h sous faible agitation. L'excès d'hydroxylamine est déterminé par titrage rapide du mélange réactionnel à un pH de 3,2 avec l'HCl (0,1 N). Un essai à blanc avec le réactif d'hydroxylamine seul est réalisé de la même manière. Le réactif d'hydroxylamine est préparé par dissolution de 5 g de chlorhydrate d'hydroxylamine dans 20 mL de NaOH (0,5 N) avant que le volume final ne soit ajusté à 125 mL avec de l'eau distillée. La teneur en carbonyle est calculée comme suit :

$$\text{Teneur en carbonyle (\%)} = (V_1 - V_2) * \text{Normalité d'acide} * 0,028 * 100 / \text{poids sec de l'échantillon (g)}$$

Avec :

V₁: Le volume de l'essai à blanc (mL).

V₂: Le volume de l'échantillon (mL).

II.2.2 Détermination de la teneur en carboxyle

La teneur en carboxyle de l'alginate de sodium oxydé par le chlore est déterminées selon un mode opératoire reporté par **Chattopadhyay et al., (1997)**. Dans un ballon de 100 mL, 1 g d'alginate oxydé est ajouté à 12,5 mL de HCl (0,1N). L'agitation magnétique est maintenue pendant 30 min. Le mélange est ensuite filtré sous vide et lavé avec de l'eau distillée. Le volume total du lavage est de 100 mL. Puis, le résidu récupéré est soigneusement placé dans un bécher de 500 mL. Le volume est ajusté à 150 mL avec de l'eau distillée. Le chauffage dans un bain marie est porté à l'ébullition sous agitation continue pendant 15 min jusqu'à sa gélatinisation complète. Le volume est ajusté encore une fois à 450 mL avec de l'eau distillée et le pH à 8,3 avec NaOH (0,01 N).

Un essai à blanc est réalisé avec de l'alginate de sodium non modifié. Le taux en carboxyle est calculé comme suit :

$$\frac{\text{Milliéquivalents d'acidité}}{100\text{g d'alginate}} = \frac{[(V_1 - V_2) \text{ mL} \times \text{Normalité de NaOH} \times 100]}{\text{poids sec de l'échantillon en g}}$$

$$\text{Pourcentage de la teneur en carboxyle} = [\text{milliéquivalents de l'acidité}/100 \text{ g d'alginate}] * 0.045$$

Avec :

V_1 : Le volume de l'échantillon (mL).

V_2 : Le volume de l'essai à blanc (mL).

II.2.3 Détermination de la teneur en aldéhyde

Le dosage de groupements aldéhyde peut se faire par la solution d'hydroxyde de sodium en utilisant la phénolphthaléine comme indicateur coloré selon la méthode décrite par **Zhang et al., (2011)**. Dans un erlenmeyer de 125 mL, 0,15 g d'alginate oxydée sont solubilisés dans 10 mL de NaOH (0,25M). Le tout est placé dans un bain marie à $T=70^\circ\text{C}$ pendant 2 min. Puis, il est refroidi à $T=25^\circ\text{C}$. Au bout d'une minute,

15 mL d'acide sulfurique (0,125M), 30 mL d'eau distillée et 1 mL de la phénolphthaléine (0,2%) sont ajoutés. Enfin, le dosage de la solution se fait avec du NaOH (0,25M) jusqu'à l'apparition de la couleur rose. On note le volume de NaOH correspondant au dosage des aldéhydes formés. Le pourcentage en aldéhyde est donné par la relation suivante :

$$DA(\%) = \frac{C_1 V_1 - C_2 V_2}{\frac{m}{198} * 1000} * 100$$

Avec :

C_1 : La concentration de NaOH (M).

C_2 : La concentration de H₂SO₄ (M).

V_1 : Le volume de NaOH (mL).

V_2 : Le volume de H₂SO₄ (mL).

198 : La masse molaire de l'unité répétitive de l'acide mannuronique.

m : La masse à l'état sec de l'alginate (g).

II.2.4 Titrations potentiométrique et conductimétrique

Les teneurs des groupements carboxyliques (COOH) portés par l'alginate et/ou par les alginates oxydés, OAlg1, OAlg2, OAlg3 ou OAlg4, sont déterminées selon le mode opératoire établi par **Zamani et al., (2010)**. Au départ, 0,1 g de chaque échantillon est dissous dans 100 mL de NaOH (0.05M). Le pH est ajusté à 11,5 et la solution est titrée par le HCl (0.1M) jusqu'à ce que le pH atteigne 2.

Les nombres d'équivalent des groupes hydroxyles issus du NaOH qui réagissent avec les -COOH de l'alginate sont calculés en utilisant la formule suivante : (**Raymond et al., 1993**)

$$[NaOH]_{\left(\frac{meq}{g}\right)} = \frac{(M \times V) \text{ de titrant}}{m}$$

Avec :

M: la concentration de NaOH (mol/l),

V: Le volume de NaOH nécessaire pour déprotomer –COOH (mL),

m: La masse de l'échantillon (g).

II.3 Etude structurale

II.3.1 Spectrophotométrie infrarouge (IR-TF)

Les spectres ont été directement enregistrés à partir des films préparés. L'appareil utilisé est un spectrophotomètre à transformée de fourrier (FTIR) de type JASCO (FT/IR-4200).

II.3.2 Spectrophotométrie UV-Vis

L'enregistrement des spectres UV-Vis se fait à partir des solutions de 5mg d'alginate ou d'alginate oxydé dans 4mL d'eau distillée. L'appareil utilisé est un spectrophotomètre UV-Vis à doubles faisceaux de type UNICAM-UV-VIS 300 (USA).

II.3.3 Radiocristallographie par diffraction des rayons X (DRX)

L'appareil utilisé est un diffractomètre de type D 8-ADVANCE-BRUKER-AXS. Les Rayons X sont produits par une anticathode de cuivre alimentée sous 40KV et 40mA. La radiation $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$) séparée au moyen d'un monochromateur arrière en graphite courbé. Les fentes de divergence et d'antidiffusion sont programmables. Le diagramme des échantillons est enregistré sur un domaine angulaire compris: $5-60^\circ$ (2θ) par pas de 0,02. Le temps de comptage est de 1 seconde par pas. Le goniomètre vertical $\theta-2\theta$ en géométrie *Bragg Brentano*. Le détecteur est à scintillation. La loi de *Bragg* établit la condition essentielle à la diffraction, à savoir : deux rayons diffusés par un cristal sont en phase et s'additionnent si la différence entre leurs chemins parcourus au sein du cristal est égale à n fois ($n = \text{nombre entier}$) leur longueur d'onde :

$$2 d_{hkl} \cdot \sin\theta = n\lambda$$

Avec :

λ : la longueur d'onde du rayonnement utilisé.

θ : l'angle de réflexion.

d : la distance réticulaire entre deux plans atomiques adjacents d'une même famille.

n : l'ordre de réflexion.

II.3.4 Microscopie à force atomique (AFM)

a. Principe

L'AFM permet d'analyser une surface point par point grâce à un balayage par une sonde, elle est utilisée pour étudier la topographie des surfaces. La sonde est constituée d'une pointe très fine, positionnée à l'extrémité d'un micro-levier flexible. Ce type de microscopie fonctionne en mesurant l'interaction attractive ou répulsive entre les atomes constituant la pointe nanométrique et les atomes superficiels d'un échantillon. L'analyse de la déviation du levier, à l'aide d'un laser, permet de déterminer le parcours exact de la pointe (**Figure II.3**).

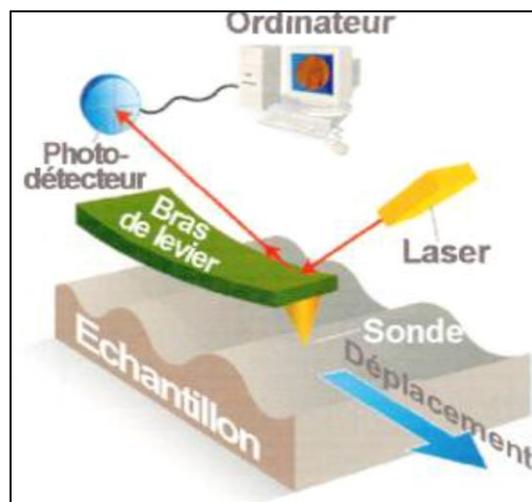


Figure II.3. Principe de fonctionnement de l'AFM (Mazen, 2003).

b. Mode utilisé

Le mode utilisé est le mode Contact. Dans ce mode, le levier muni de la pointe détectrice appuie sur l'échantillon en analyse. Une force répulsive entre la surface et la pointe se crée car il y a répulsion des électrons de l'échantillon et de la pointe. Dans ce

cas, l'interaction faible entre l'échantillon et la pointe est maintenue constante en changeant la hauteur de l'échantillon dans l'appareil. La variation de la hauteur donne la hauteur de la surface à l'endroit étudié (**Radmacher *et al.*, 1995**).

c. Appareillage

La surface des échantillons est imagée à l'aide d'un microscope à force atomique MFP-3D Classic de type Asylum Research an Oxford Instruments company équipé d'un scanner. Les images topographiques sont acquises en mode contact à température égale à 25°C à l'aide de pointes "V" en silicium Si. La fréquence d'excitation de la pointe est, dans chaque cas, fixée autour de 300 KHZ et la vitesse de balayage à la surface de l'échantillon est de 1Hz.

II.4 Etude mécanique par le test du gonflement

Les tests de gonflement sont réalisés dans des béchers en verre de 25 mL. On ajoute 20 mL d'eau distillée à la masse initiale de films qui est de 0,08g. Les mesures du poids se font en fonction du temps à température ambiante.

Le taux de gonflement exprimé en pourcentage massique "G" est calculé à partir de l'expression suivante:

$$G\% = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100$$

Avec :

M_t : Masse du film gonflé dans le solvant pendant un temps t.

M₀ : Masse initiale du film à t=0.

II.5 Etudes biologiques

II.5.1 Biocompatibilité des films avec le sang humain

Le potentiel hémolytique est la mesure de l'hémolyse qui peut être causée par le matériau quand il entre en contact avec le sang. Le potentiel hémolytique des échantillons est déterminé selon **Fan *et al.*, (2012)**. 0,1 mL du sang humain anti-coagulé par le citrate de Na est ajouté à 7,5 mL de PBS (pH=7) contenant 0,15 g de l'échantillon dans différents tubes à essai. Un control positif (100% hémolysé induit

par remplacement du PBS (pH=7) avec 7,5 mL de solution Na₂CO₃ à 0,1%) et un autre négatif (0% d'hémolyse, PBS (pH=7) sans ajout de l'échantillon) ont également été préparés. Tous les tubes à essai contenant les échantillons et les témoins sont placés à l'abri de la lumière pendant 1 heure à 37°C. Ensuite, les tubes sont centrifugés à 300 rpm pendant 10 min. Le pourcentage d'hémolyse est calculé en mesurant la densité optique (DO) du surnageant de la solution à 545 nm selon la formule suivante :

$$Hémolyse(\%) = \left(\frac{DO_{échantillon} - DO_{control\ négatif}}{DO_{control\ positif}} \right) \times 100\%$$

II.5.2 Activité anti-inflammatoire

Différentes concentrations de films sont mélangées avec 2,8 mL de tampon phosphate (pH 6,4) et 2 mL de blanc d'œuf dans différentes tubes à essai. Tous les tubes à essai contenant les échantillons ou les témoins sont laissés incuber pendant 15 min à 27°C. Ensuite, on chauffe à 70°C pendant 10 min. Puis, on laisse revenir à la température ambiante. Le pourcentage d'inhibition est calculé en mesurant l'absorbance de la solution à 660 nm dans un spectrophotomètre UV/Vis selon la formule suivante :

$$Inhibition(\%) = \frac{(A_{échantillon} - A_{eau})}{A_{eau}}$$

II.5.3 Activité antibactérienne

Trois souches bactériennes sont utilisées, une à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et deux à Gram négatifs (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Le milieu de culture utilisé est la gélose Muller–Hinton. La préparation du milieu de culture se fait selon **Benzeggouta (2005)**. On met en suspension 38 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. On porte lentement le

milieu à ébullition sous agitation constante jusqu'à l'obtention d'une solution qui est ensuite répartie dans des flacons. La stérilisation se fait à l'autoclave à 115°C pendant 15 minutes. La solution est versée dans des boîtes de Pétri de telle façon à obtenir une couche de 4 mm d'épaisseur.

Les bactéries sont conservées et maintenues en vie par des repiquages continus, sur divers milieux de culture solides et liquides. La concentration minimale des bactéries utilisées est de 10^6 .

CHAPITRE III :
RÉSULTATS ET DISCUSSION.

I. Dosages chimiques

I.1 Teneur en carbonyle

Les résultats de dosage par l'hydroxylamine des alginates oxydés par l'hypochlorite de Na sont donnés dans le **tableau III.1** et dans la **figure III.1**. Ils montrent que les teneurs en groupements carbonyles augmentent avec la concentration de l'agent oxydant.

Tableau III.1 : Teneurs en groupements carbonyle après oxydation de l'alginate par le NaOCl.

Matrice étudiée	OAlg1	OAlg2	OAlg3	OAlg4
% en groupements carbonyle	0,62	1,15	1,35	1,43

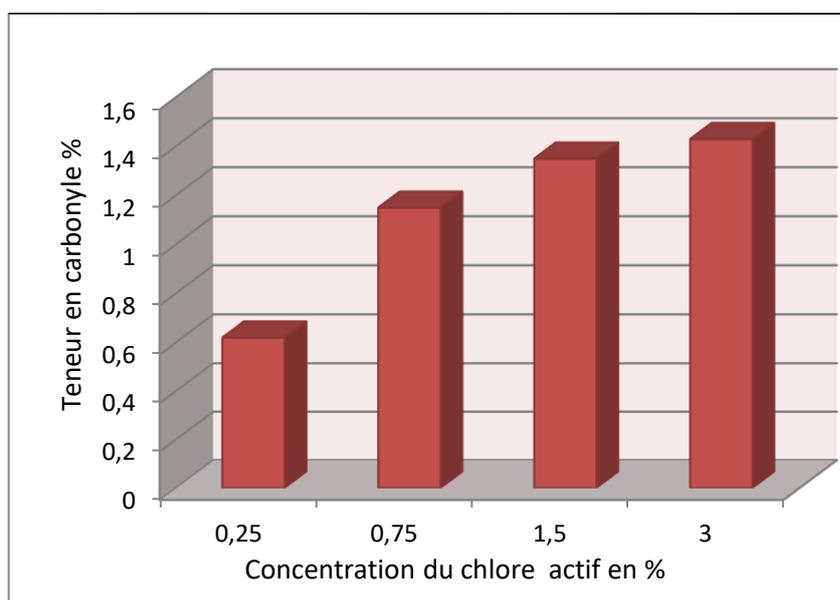


Figure III.1 : Teneurs en groupements carbonyle en fonction de la concentration de Cl actif.

I.2 Teneur en carboxyle

Les résultats du dosage par un titrage pH métrique des alginates oxydés par l'hypochlorite de Na sont donnés dans le **tableau III.3** et la **figure III.2**.

Tableau III.2 : Teneurs en groupements carboxyle après oxydation de l'alginate par le NaOCl.

	OAlg1	OAlg2	OAlg3	OAlg4
% en groupements carboxyles	0,18	0,52	0,93	1,29

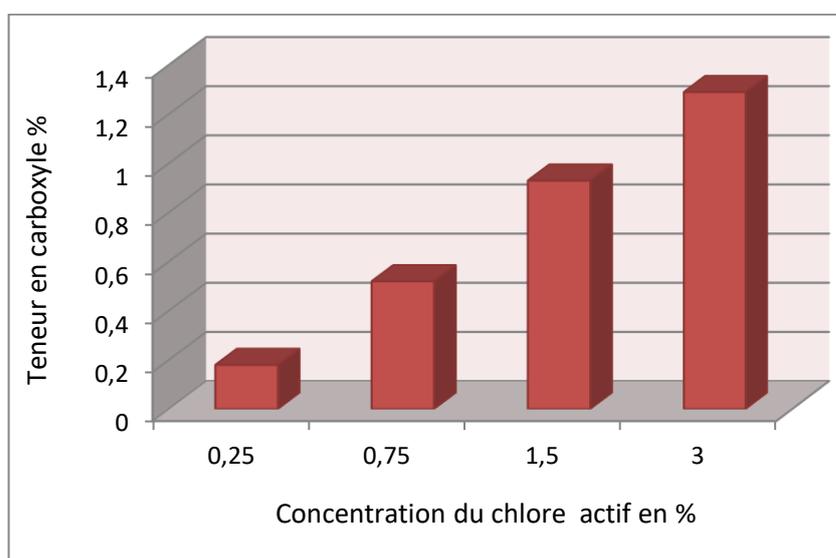


Figure III.2 : Teneur en groupements carboxyles en fonction de la concentration de Cl actif.

Ce type de dosage révèle aussi que la quantité des carboxyles (%) augmente avec la concentration de l'hypochlorite de sodium.

Ces résultats s'expliquent d'une part par la conversion des aldéhydes en groupe acide carboxylique. Et d'autre part, il est plausible qu'une fracture ou une scission des liaisons glucosidiques peuvent surgir et elles seront accompagnées d'un changement dans la structure des extrémités réductrices des chaînes d'alginate. Ce qui va conduire à la formation de groupes -COOH (Li *et al.*, 2010).

I.3 Teneur en aldéhyde

Les résultats de la teneur en aldéhyde des alginates oxydés par l'hypochlorite de Na sont donnés dans le **tableau III.4** et la **figure III.3**.

Tableau III.3 : Teneurs en groupements aldéhydes après oxydation de l'alginate par le NaOCl.

	OAlg1	OAlg2	OAlg3	OAlg4
% en groupements aldéhyde	0,22	0,31	0,42	0,19

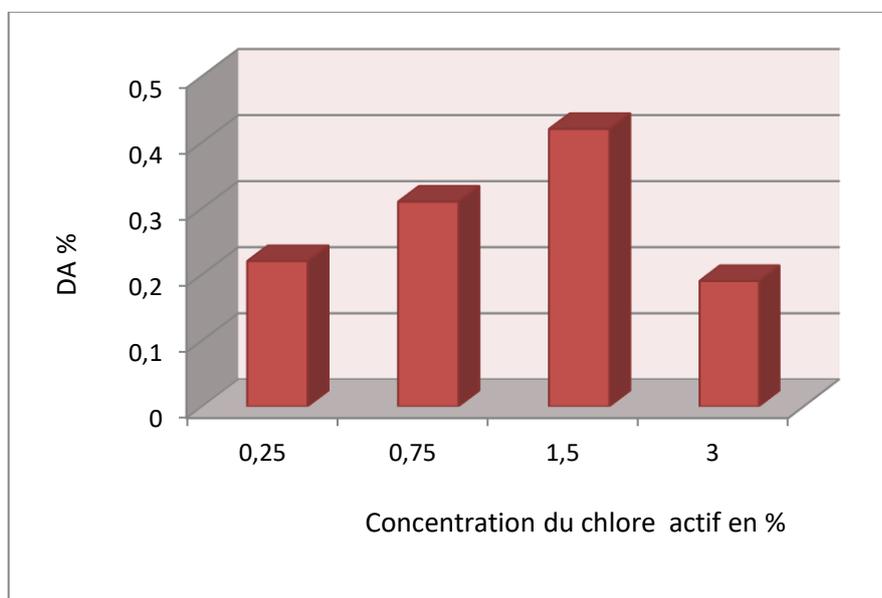


Figure III.3 : Teneur en groupements aldéhyde en fonction de la concentration de Cl actif.

La teneur en aldéhyde augmente jusqu'à 0,42 %, pour les alginates oxydés par le chlore actif à 1,5%, puis diminue jusqu'à 0,19% quand la concentration en chlore actif atteint 3%. Cela s'explique comme il a été indiqué précédemment dans le dosage des carbonyle que la formation des groupes d'aldéhyde ou carbonyle est suivie par une conversion oxydative en acide carboxylique (**Kuakpetoon *et al.*, 2006**).

I.4 Titrations potentiométrique et conductimétrique

Le titrage conductimétrique est un outil analytique bien connu pour quantifier les groupes fonctionnels acides. De nombreuses applications de cette technique sont déjà connues, telles que la mesure du nombre de groupes acide carboxylique et sulfonique, la quantification d'acides forts et faibles, et la caractérisation de l'héparine qui est un

glycosaminoglycane. En fait, c'est une des techniques la plus précise pour analyser les polysaccharides multifonctionnels (**Raymond et al., 1993**).

Par ailleurs, il est déjà prouvé que le titrage conductimétrique se fait par le suivi du changement de la conductivité (dû aux ions H^+ et OH^- qui sont les plus conducteurs de tous les ions) en fonction du volume du titrant ajouté.

Différents points de transition sur les courbes de pH et de conductivité ont confirmé la présence de groupes acide carboxylique dans la structure chimique des films préparés. Les points de transition sur la courbe de conductivité ont été déterminés par la variation de la pente (points d'inflexion) et l'intersection des lignes en pointillées verticales avec la courbe de pH (**Dhar et al., 2012**).

Toutes nos courbes de titrage (**Figure III.4**) présentent trois régions distinctes. La première zone (à partir de la gauche) correspond à la neutralisation de l'excès de la base. La deuxième région est assignée à la protonation des groupes carboxyles portés par les chaînes d'alginate ou des alginates oxydés.

Les quantités de $-COO^-$ sont alors estimés respectivement dans le cas de l'Alg, OAlg1 et OAlg4 à 1,49 meq/g, 1,60 meq/g et 1,70 meq/g. Enfin, la troisième région représente l'excès d'acide dans la solution.

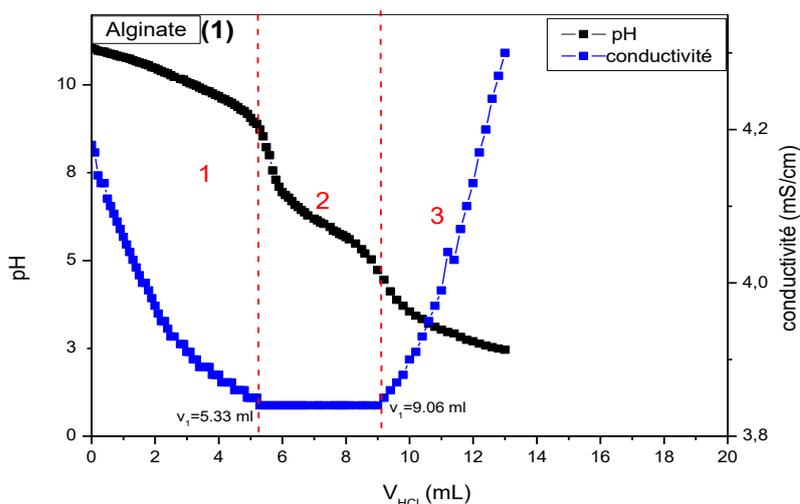


Figure III.4 : Variations de la conductivité électrique et du pH de l'alginate (1) et des alginates oxydés, OAlg1(2) et OAlg4 (3) (voir suite en page suivante).

Figure III.20 : Variations de la conductivité électrique et du pH de l'alginate (1) et

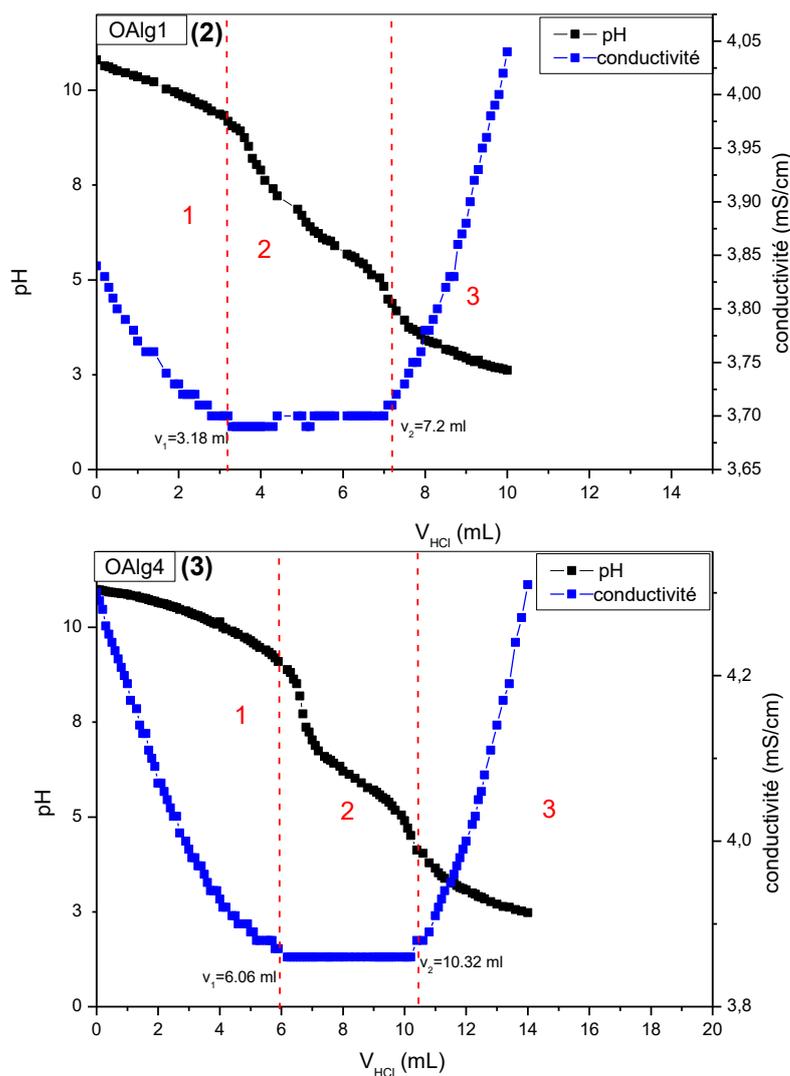


Figure III.4 : Variations de la conductivité électrique et du pH de l'alginate (1) et des alginates oxydés, OAlg1(2) et OAlg4 (3).

II. Etude structurale

II.1 Spectrophotométrie infrarouge (IR-TF)

La figure III.5 illustre les spectres IR-TF de l'alginate et des alginates oxydés à différentes concentrations de chlore actif. Des modifications structurales sont observées et de nouveaux groupements fonctionnels chimiques sont identifiés.

- **Alginate**

L'alginate a exhibé une large bande entre $3425-3383\text{ cm}^{-1}$ attribuée à la vibration de valence de la liaison de groupes OH, et en raison de l'effet de la tension du cycle

hexatomic de l'alginate de sodium (Lu *et al.*, 2009), la vibration d'élongation asymétrique de la liaison C-H apparaît aux environs de 2932 cm^{-1} (Fan *et al.*, 2013).

Les bandes d'absorption caractéristiques de la structure du polysaccharide autour de 1298 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation C-C-H et O-C-H. Ainsi, les bandes à 1127 cm^{-1} et à 1036 cm^{-1} sont dues aux vibrations d'élongation de C-O. Aussi, la bande à 1094 cm^{-1} peut être attribuée aux vibrations d'élongation du C-O et C-C du noyau pyranose (cycle à 5 carbones et un atome d'oxygène).

En plus, en raison d'exister sous forme de sels de sodium, les groupes carboxyliques de l'alginate de sodium forment l'anion de carboxylate, dans lequel les deux liaisons de C=O sont semblables et sans différence entre les liaisons simples et doubles ; donc, ces vibrations d'élongation asymétrique et symétrique apparaissent respectivement à 1620 cm^{-1} et à 1414 cm^{-1} (Li *et al.*, 2010 ; Lu *et al.*, 2009).

La vibration d'élongation de COOH est à 1600 cm^{-1} alors que celle de C-O-C sort entre 1020 et 1036 cm^{-1} (Bajpai *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2000).

Une autre bande caractéristique de l'alginate de sodium apparaît à 819 cm^{-1} (bande de Na^+/O^-) (Baysal *et al.*, 2013).

- **Alginates oxydés**

Le spectre de l'alginate oxydé révèle, en général, les pics caractéristiques de l'alginate mais avec quelques différences. Par exemple, les pics à 1620 cm^{-1} et à 1414 cm^{-1} ont changé de forme et deviennent plus larges et plus intenses sur les spectres des alginates hautement oxydés. Cela peut être expliqué par la formation de nouveaux groupements carboxyles.

Nous avons en plus des pics caractéristiques des groupements carbonyles C=O à 1652 cm^{-1} et 893 cm^{-1} (pic attribué à la forme hydratée des aldéhydes et cétone) qui deviennent plus intenses avec le temps de la réaction d'oxydation. La balance (en intensité) entre les deux bandes à 1600 cm^{-1} et 1094 cm^{-1} change en faveur de celui à 1600 cm^{-1} jusqu'à ce que ce dernier se mette au même niveau avec le pic à 1094 cm^{-1} .

Les bandes caractéristiques de C(O)-H des groupes aldéhydes devraient être à 2820 cm^{-1} et à 2720 cm^{-1} , mais ils ont été masquées par la vibration de la bande des alkyles de C-H (Lu *et al.*, 2009).

On remarque aussi l'intensification de la bande à 953 cm^{-1} . Ce qui confirme la formation des groupements carboxyles. Ce pic est relié à la vibration de déformation de C-O de résidus d'acides uroniques (**Li *et al.*, 2010**).

On doit signaler l'élargissement progressive de la bande des -OH entre 3425 et 3383 cm^{-1} , nous nous penchons dans ce cas et sans aucune ambiguïté vers la formation des carboxyles.

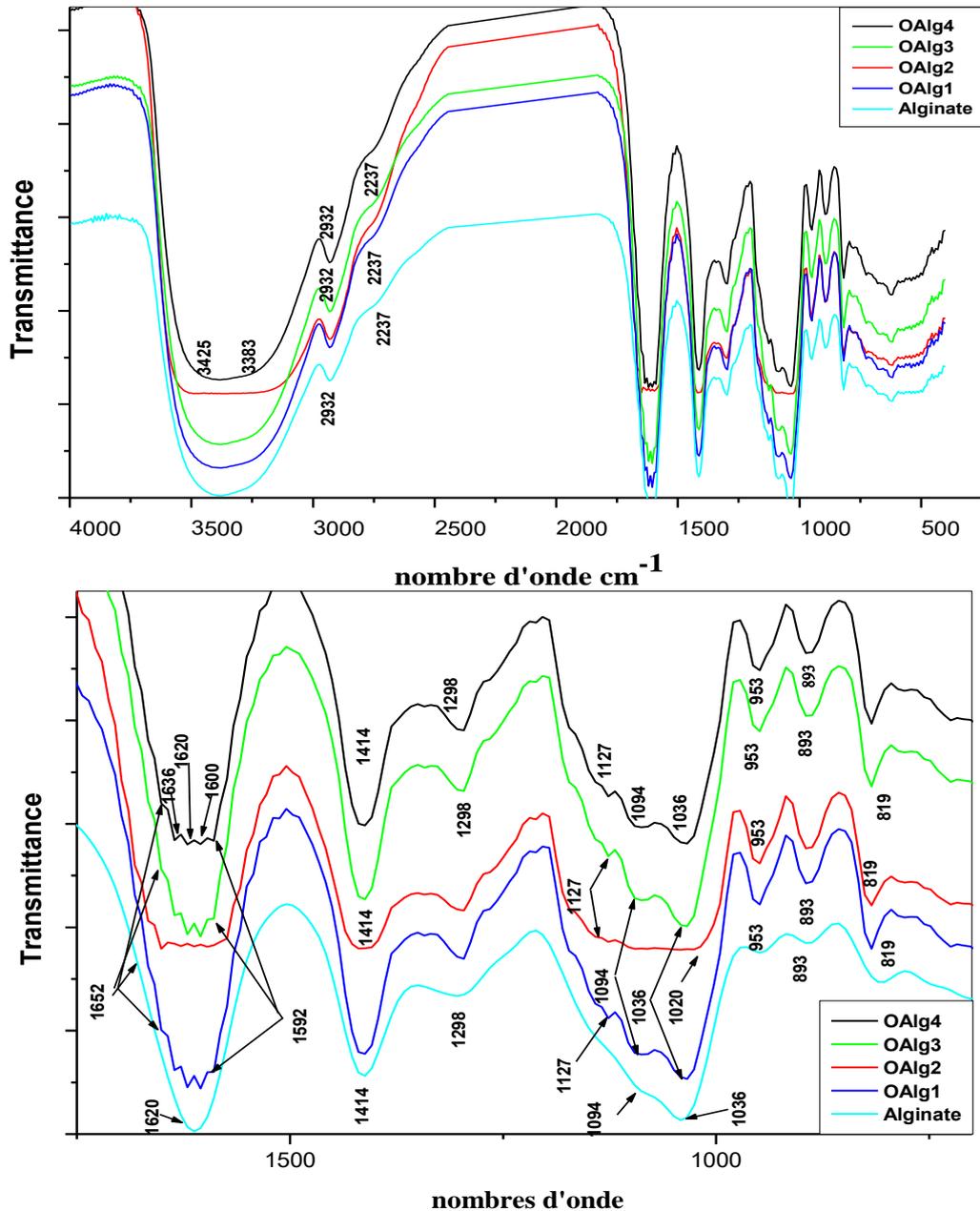


Figure III.5 : Spectres IR-TF de l'alginate, OAlg1, OAlg2, OAlg3 et OAlg4.

Trois réactions possibles peuvent être suggérer suite à l'action de l'hypochlorite sur l'alginate. Il y a la transformation des hydroxyles en carbonyles, l'oxydation des carbonyles en carboxyles ; et aussi, la dépolymérisation de l'alginate (**Figure III.6**).

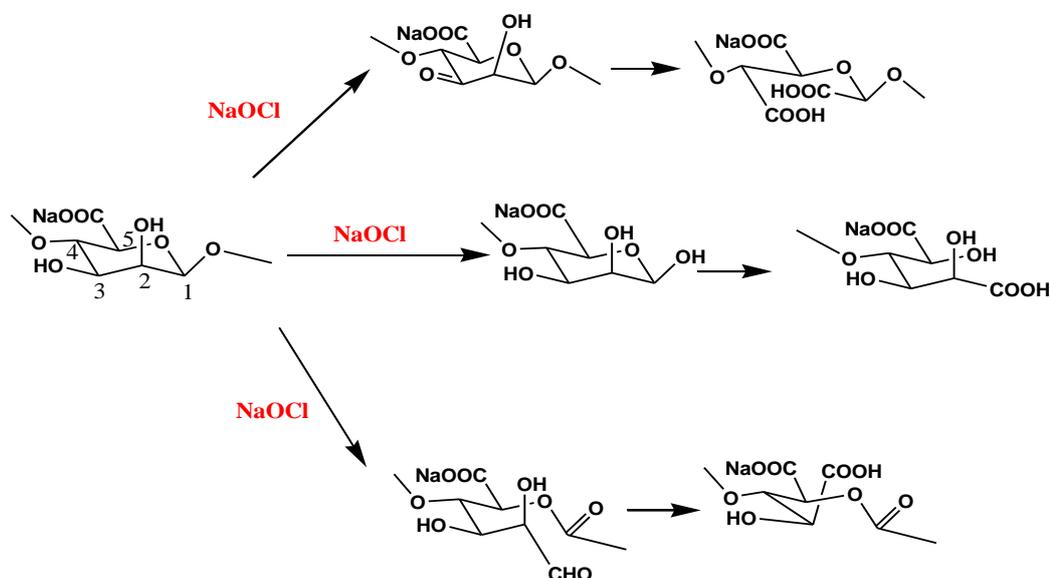


Figure III.6 : Conversions les plus probables de l'alginate suite à son oxydation par l'hypochlorite de sodium.

Nous devons évoquer qu'une étude similaire a été menée au niveau de notre laboratoire (**Chetouani et al., 2017**) sur la pectine. Il a été démontré que les attaques sont non sélectives mais les plus plausibles se font en position 1, 2 et 2, 3.

II.2 Spectrophotométrie UV-Vis :

La **figure III.7** montre les spectres UV-Vis de l'alginate et des alginates oxydés par le chlore actif à différents pourcentages. Nous notons que l'alginate présente une bande d'absorption située à 272nm ayant une faible intensité. Après oxydation par le NaOCl, nous observons que cette bande qui correspond à la transition de $n-\pi^*$ du groupement C=O de l'aldéhyde ou d'une cétone (**Silverstein, 1998**) augmente avec le pourcentage de l'agent oxydant (NaOCl).

Nous citons à titre d'exemple, concernant l'alginate oxydé à 3% de chlore actif, l'absorbance de la bande à 272 nm augmente pour atteindre la plus grande valeur égale

à 1,38 en comparaison à celles des autres alginates oxydés avec les différents pourcentages en chlore actif utilisés. Ce résultat peut être expliqué par la formation des nouveaux groupements carbonyles au cours de la réaction d'oxydation.

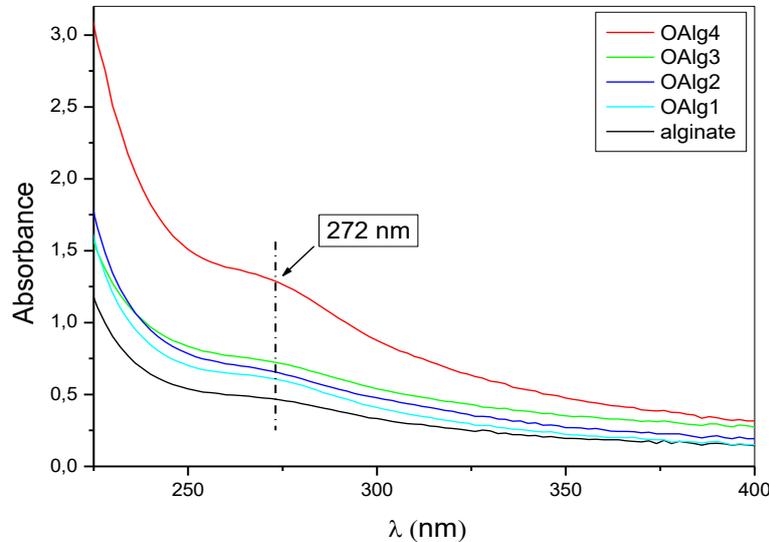


Figure III.7 : Spectres UV-Vis des films d'alginate et des alginates oxydés par le chlore actif à différentes concentrations.

II.3 Diffraction des rayons X

L'alginate de sodium possède une structure cristalline. Les trois pics caractéristiques se visualisent d'après la bibliographie (**Kuila *et al.*, 2014 ; Mandal *et al.*, 2013**) à $14,3^\circ$, $21,3^\circ$ et $40,2^\circ$. Ce qui est en analogie avec nos résultats (**Figure III.8**).

Par contre, après oxydation, les différents diffractogrammes changent d'allure. L'empreinte de celui de l'alginate a tendance à disparaître avec l'oxydation. Il y a apparition de deux nouveaux pics (**Figure III.8**), l'un fin et intense à $2\theta=17,1^\circ$ et l'autre large à $2\theta=30,5^\circ$; et cela quelque soit la concentration en chlore actif utilisée.

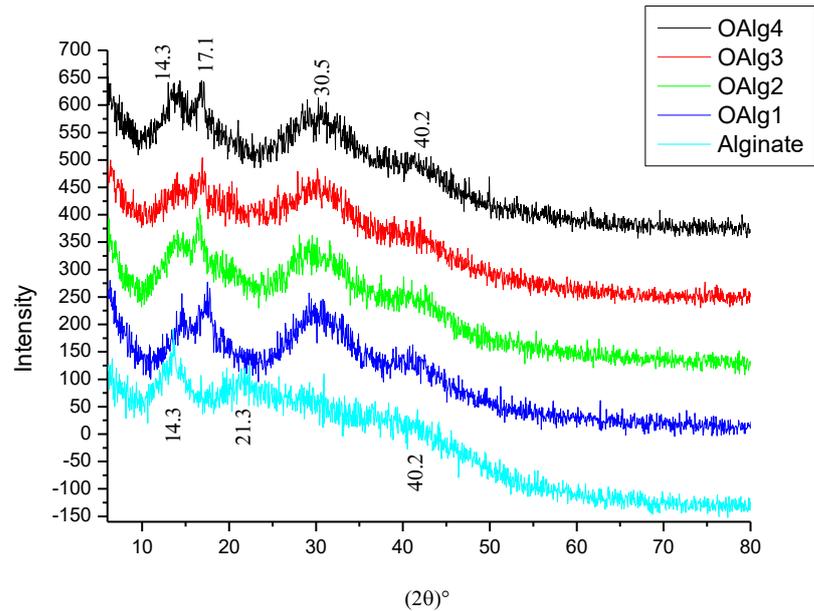


Figure III.8 : Diffractogrammes de l’alginate et des alginates oxydés par le chlore actif.

II.4 Microscopie à force atomique (AFM)

La microscope à force atomique, l'AFM, est une technique prouvée d'être un outil utile dans l'imagerie des échantillons biologiques comme les protéines, l'ADN, ou même des cellules complètes (**Radmacher *et al.*, 1995**).

Nous avons essayé d'élucider les propriétés de surface des films d'alginate et celles des alginates oxydés par AFM.

À partir de la figure suivante, l’alginate montre une surface différente à celles des alginates oxydés. Les agrégats de petites tailles apparaissent sur l'alginate alors que, dans les alginates oxydés, ils sont beaucoup plus importants en volume. Ils augmentent avec l'oxydation et atteignent des hauteurs maximales pour l’OAlg4 de 457,24nm (**Figure III.9**). Ces amas peuvent être dus à des zones cristallines qui se sont formées suite au processus d’oxydation. Ce qui est en accord avec les résultats obtenus par DRX où la cristallinité de l’alginate augmente avec la réaction d’oxydation.

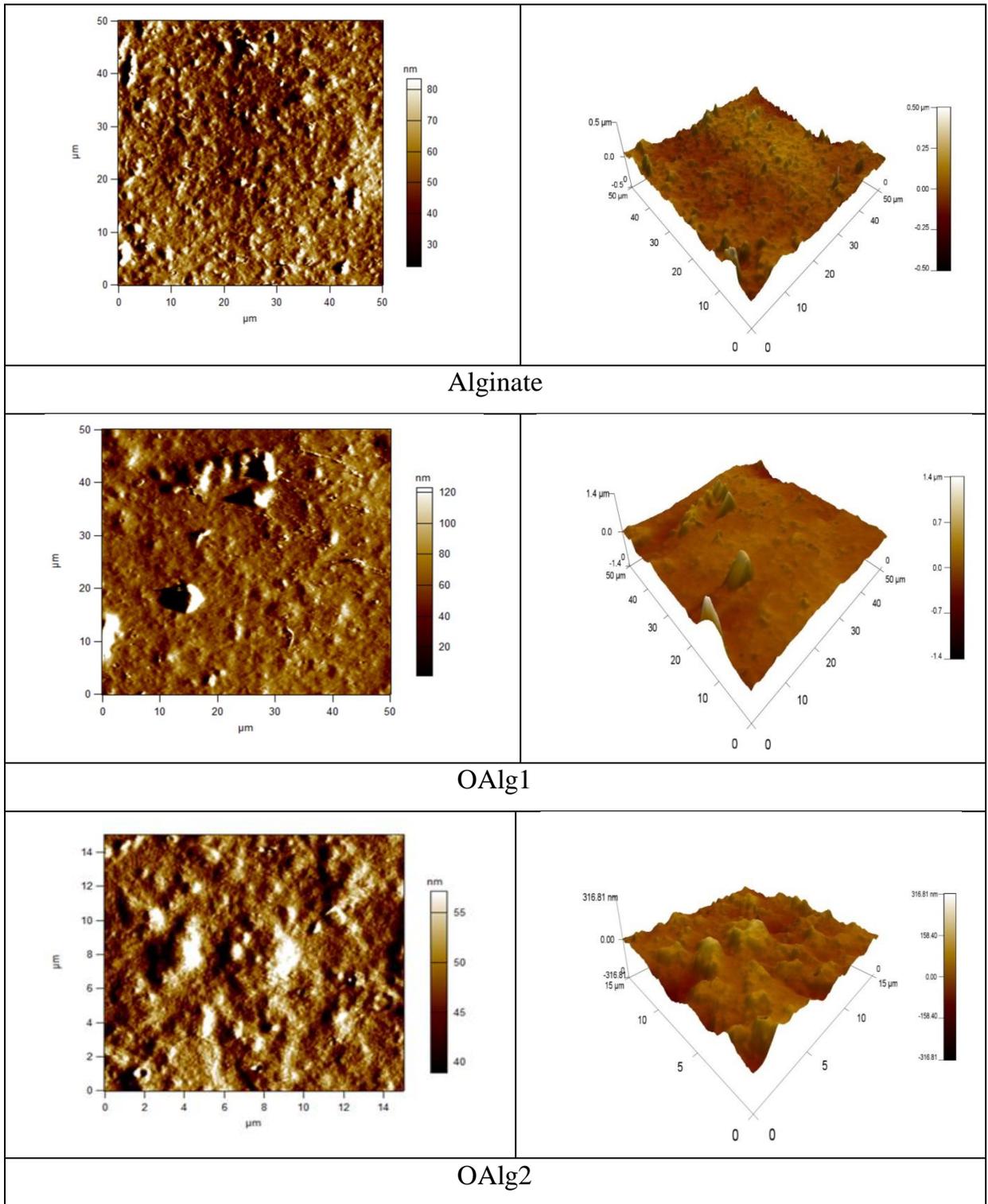


Figure III.9 : Images par AFM des films des différents alginates étudiés (voir la suite de la figure dans la page suivante).

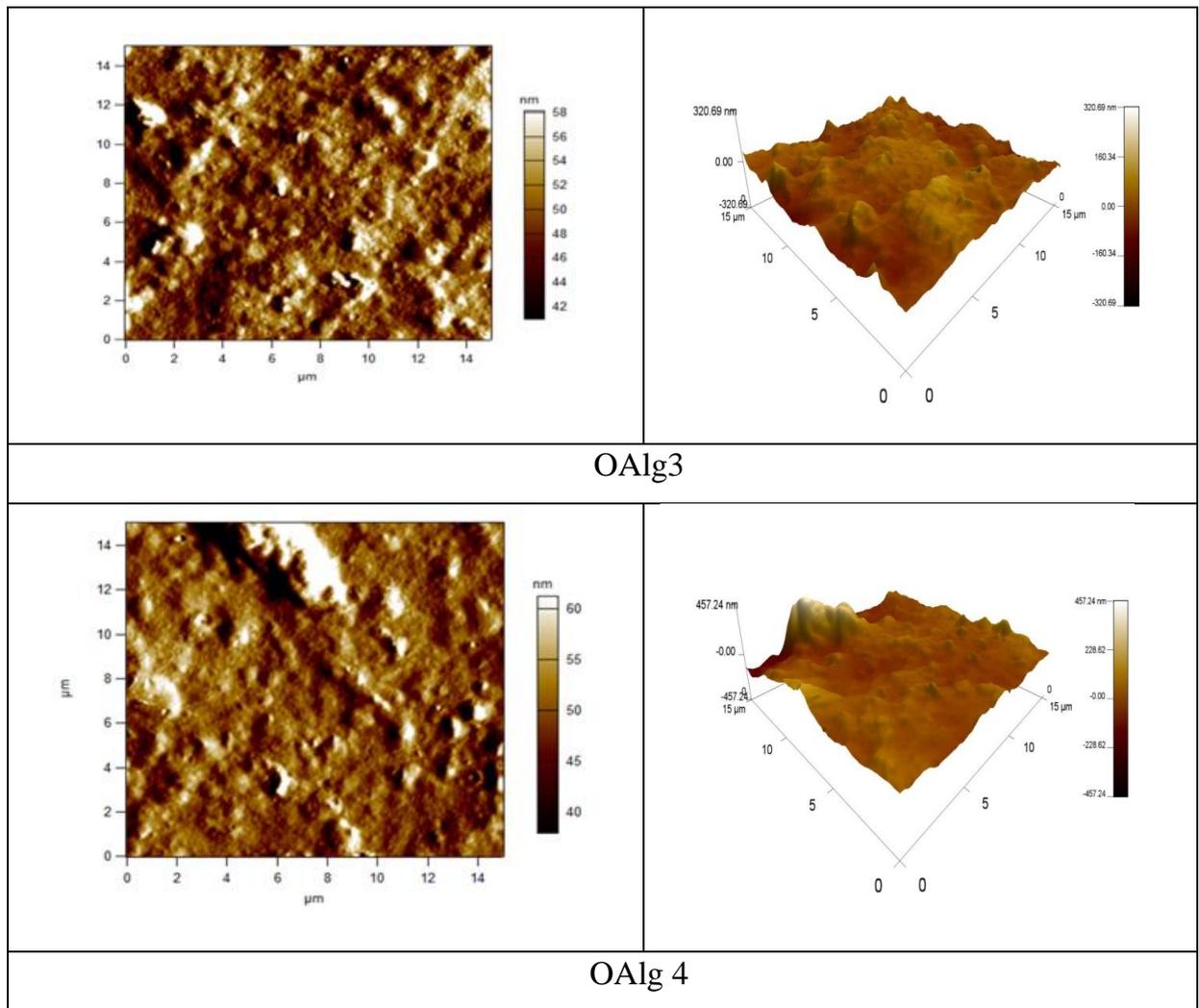


Figure III.9 : Images par AFM des films des différents alginate étudiés.

III. Etude mécanique par le test de gonflement

On doit noter que pour l'alginate seul, son G_{max} n'a pas pu être mesuré à cause de la formation du gel d'alginate qui est difficile à manipuler en milieu aqueux.

Toutes les courbes montrent une augmentation rapide suivie d'une chute vers des plateaux à partir desquels les G_{max} sont donnés dans le **tableau III.4** et dans la **figure III.10**. Ces résultats peuvent être expliqués par l'établissement de nouveaux réseaux de plus en plus discontinus et à tendance hydrophile.

Tableau III.4 : Gmax des différents matériaux étudiés à base d'alginate mesurés à l'équilibre pendant 1h à T_{amb}

.Matrice étudiée	Alginate	OAlg1	OAlg2	OAlg3	OAlg4
Gmax%	-	24,08	96,7	115,14	143,19

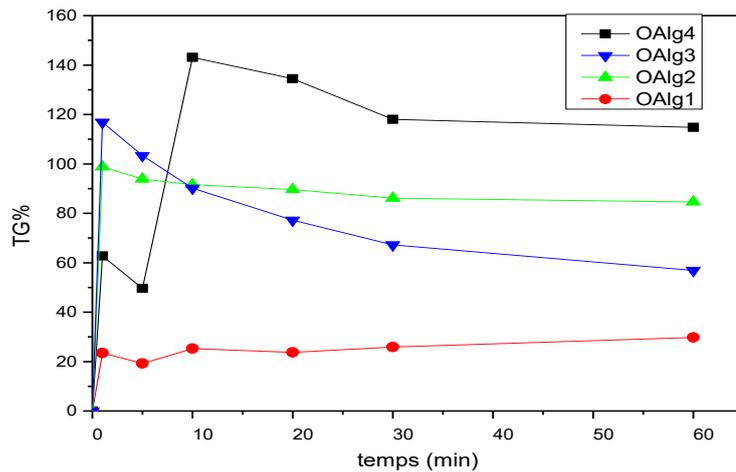


Figure III.10 : Variations des taux de gonflement (TG%) des différents films à T_{amb} en fonction du temps.

IV. Etudes biologiques

IV.1 Biocompatibilité des films avec le sang humain

Le potentiel hémolytique du matériau est défini par la mesure du degré d'hémolyse qui pourrait être causé par le matériau quand il entre en contact avec le sang.

La biocompatibilité des échantillons, alginate et alginates oxydés, a été étudiée par le test *in vitro* d'hémocompatibilité.

Le **tableau III.5** représente les valeurs obtenues à partir de ce test d'hémolyse (en pourcentage).

Les hydrogels se montrent non hémolytiques. L'activité hémolytique observée

est inférieure à 10%. Ce qui traduit la marge de biocompatibilité avec le sang (**Lee et al., 2004 ; Fan et al., 2013**).

Tableau III.5 : Potentiel hémolytique des alginates étudiés.

Echantillon	Alg	OAlg1	OAlg2	OAlg3	OAlg4
Hémolyse (%)	1,9	2,1	2,65	3,5	3,75

IV.2 Activité anti-inflammatoire

L'effet inhibiteur de nos échantillons ainsi que celui des médicaments anti-inflammatoires sur la dénaturation de la protéine, l'albumine, sont donnés dans les **tableaux III.6 & III.7**.

Il apparaît que l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des différents alginates étudiés est significativement inférieure à celle des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) utilisés, le Diclofénac de sodium (à 100µg/mL et 200 µg/mL) et l'ibuprofène (à 100µg/mL et 200 µg/mL). Mais, nous remarquons que l'effet inhibiteur de nos matériaux évolue avec le taux d'oxydation et la concentration.

Tableau III.6 : Effets anti-inflammatoires des matériaux étudiés *In-vitro* par la dénaturation de l'albumine de l'œuf.

	Alg	OAlg1	OAlg2	OAlg3	OAlg4
Concentration (mg/ml)	Inhibition (%)				
1,5	2,88	0,40	0,44	0,60	1,56
1	2,72	0,40	0,80	1,60	2,44
0,5	2,60	0,92	1,12	2,24	3,24
0,25	2,40	0,76	1,28	3,48	3,84

Une explication à ce phénomène peut être donnée comme suit. Etant donné que la plupart des AINS possèdent dans leur structure un acide carboxylique qui est

probablement l'un des facteurs responsable de l'action anti-inflammatoire et que jusqu'à ce jour aucun mécanisme d'action de la plupart des AINS n'a été mis au point clairement y compris celui de l'ibuprofène et du diclofénac de sodium. L'augmentation du ratio en groupes carboxylique dans l'alginate suite à son oxydation ou en fonction de sa masse moléculaire entraîne cette évolution en action inhibitrice de la dénaturation de l'albumine.

Tableau III.7 : Effets anti-inflammatoires de l'Ibuprofène et du Diclofénac de sodium *in vitro* par la dénaturation de l'albumine de l'œuf.

Ibuprofène		Diclofénac de sodium	
Concentration (µg/mL)	Inhibition (%)	Concentration (µg/mL)	Inhibition (%)
100	98,02	100	63,31
200	125,25	200	76,51

IV.3 Activité antibactérienne

L'activité des films à base de biopolymères provenant de sources marines comme l'alginate et le carraghénane en tant qu'agents antimicrobiens n'a pas été étudiée de manière approfondie jusqu'à nos jours (**Pielesz *et al.*, 2011**).

Tang *et al.*, (2016) ont préparé des nanobiocomposites à base d'alginate de sodium qui montrent une activité antibactérienne significative contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Cette activité antibactérienne a été expliquée par l'élimination de la membrane externe des bactéries et la distribution anormale du cytoplasme qui conduisent, finalement, à la mort des cellules microbiennes anioniques.

En général, tous nos films manifestent une activité antibactérienne à l'égard des souches étudiées (**Tableau III.8**).

Les diamètres d'inhibition des films oxydés sont supérieurs à ceux de l'alginate seul. Nous dénotons quelques exceptions où la sensibilité de la souche *Pseudomonas aeruginosa* est moins sensible au film oxydé à 3% de Cl actif. Aussi, le

Staphylococcus aureus a montré une sensibilité identique à l'encontre des films préparés sauf pour celui oxydé à 1,5% de Cl actif.

Tableau III.8 : Diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne (mm).

Bactérie échantillon	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Alg	10mm	10mm	10mm
OAlg1	10mm	15mm	10mm
OAlg2	11mm	16mm	10mm
OAlg3	13mm	10mm	9mm
OAlg4	15mm	8mm	10mm

PATRIE II :

LA RÉACTION DE MAILLARD

CHAPITRE I :
GÉNÉRALITÉS SUR LA RÉACTION DE
MAILLARD

I. Historique

Les flaveurs sont produites dans la nature soit par l'action d'enzymes soit par des processus thermiques dus aux interactions entre différents précurseurs et à leurs produits de dégradation. L'interaction de sucres réducteurs tels que le glucose ou le fructose et d'acides aminés et l'ensemble de leurs réactions successives est appelée brunissement non-enzymatique ou encore réaction de Maillard (**Maillard, 1912**).

Cette réaction est considérée comme la plus importante dans la chimie des aliments. Elle a lieu lors du stockage des aliments ou plus fréquemment lors de leur traitement par des processus thermiques. Il a aussi été démontré qu'elles sont responsables de la formation de couleurs et d'antioxydants (**Manzocco et al., 2001**).

La réaction de Maillard, décrite pour la première fois par *Louis-Camille Maillard en 1912*, est une description générale d'une série complexe de réactions impliquant la réaction des groupes amines libres, par des acides aminés, des peptides ou des protéines avec des composés carbonylés en particulier des sucres réducteurs (**Fayle et al., 2002**).

Après plus d'un siècle de recherche sur ce type de réaction, les produits de la réaction de Maillard n'ont commencé à être identifiés que récemment et les voies mécanistiques conduisant à leur formation ne sont que progressivement élucidées. La réaction de Maillard est particulièrement importante dans les systèmes alimentaires où les produits de la réaction peuvent être responsables de l'arôme, du goût et de l'apparence des aliments. Elle peut également provoquer une détérioration des aliments pendant le stockage et le traitement des aliments, entraînant une diminution de la qualité nutritionnelle des aliments en diminuant la concentration et donc la disponibilité des acides aminés essentiels (**Kaanane et al., 1989**).

II. Etapes de la réaction de Maillard

La réaction de Maillard se compose de trois étapes principales. La première étape conduit à la formation d'une carbonylamine, correspondant à une liaison covalente entre un groupement carbonyle et une fonction NH₂ d'un acide aminé libre ou protéique. Puis, la seconde étape aboutit à des produits bruns ou fluorescents appelés AGE (Advanced Glycated End products) ou PTG (Produits Terminaux de

Glycation) pour décrire les produits obtenus dans le cadre de l'utilisation d'un dérivé saccharidique avec une fonction amine libre. Enfin, l'étape finale conduit à la polymérisation en mélanoidines (**Oliveira *et al.*, 2014**).

II.1 Etape initiale

La glycation est la formation non enzymatique d'une liaison covalente entre le groupement carbonyle et le groupement amine libre d'un acide aminé (**Figures II.1**). Dans une série de réactions réversibles, le groupement carbonyle de la molécule de sucre forme une base de Schiff. La base de Schiff résultante est labile et peut subir deux réarrangements séquentiels, produisant un aminokétose raisonnablement stable qui s'appelle le produit d'Amadori (**Fayle *et al.*, 2002**).

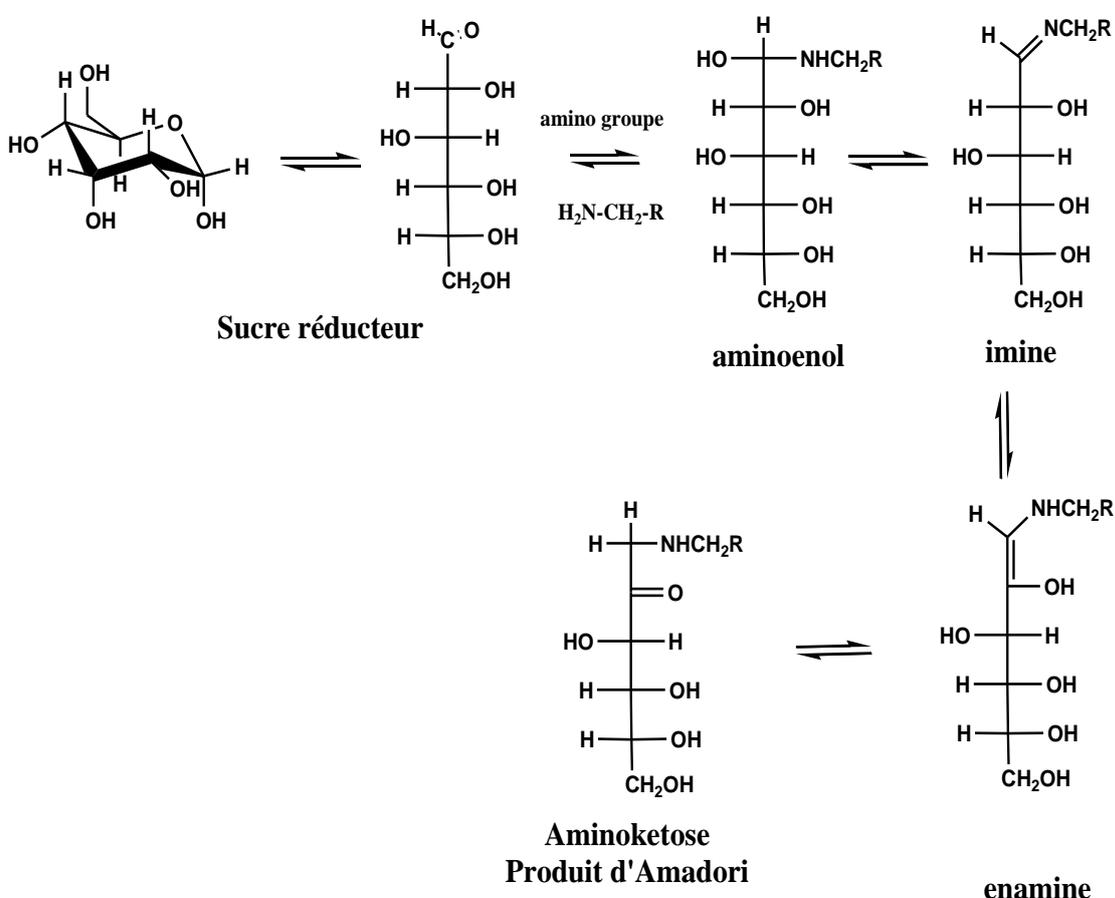


Figure I.1 : Etapes initiales de la réaction de Maillard, du sucre et groupe amine au produit d'Amadori (**Fayle *et al.*, 2002**) .

II.2 Etape intermédiaire

Cette étape est plus complexe car elle est composée de trois réactions : deux qui dépendent du pH, et une troisième qui correspond à une scission des aldosesamines ou des cétosamines.

La première est appelée **déshydratation modérée**. Elle est favorisée aux pHs neutres et alcalins, et elle consiste en une énolisation irréversible entre les carbones 2 et 3 et une perte du résidu aminé (**Figure II.2**). Le composé intermédiaire, 1-méthyl-2,3-dicarbonyl, est une réductone (dicétone) responsable du caractère autocatalytique de la réaction de Maillard *via* la dégradation de STRECKER. Cette réductone se décompose de manière complexe en une grande variété de composés à fonction mono et dicarbonyl tels que les furanones, les cyclopentanones et les isomaltols (**Ledl et al., 1990**).

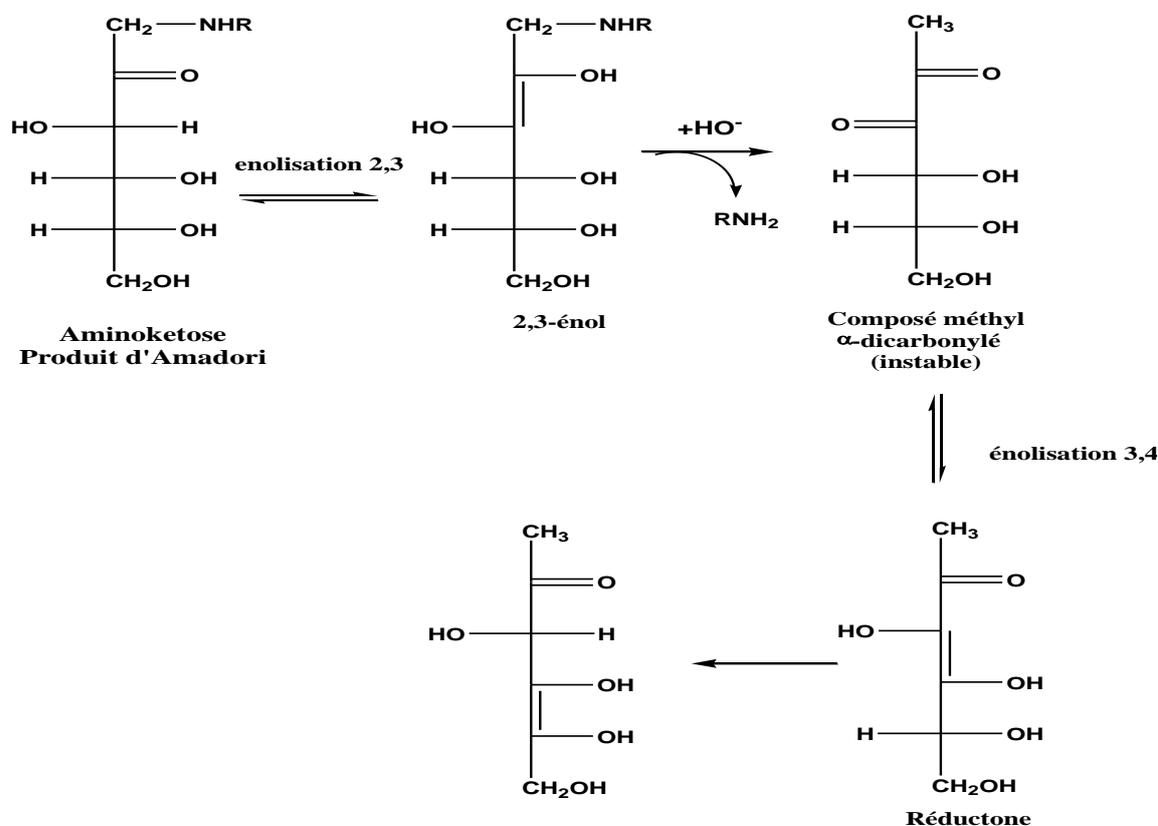


Figure I.2 : Seconde étape de la réaction de Maillard, déshydratation modérée (**Ledl et al., 1990**).

La deuxième est appelée **déshydratation forte**, favorisée par les pHs acides. Elle est la principale voie de dégradation des cétosamines (**Figure II.3**). Elle débute par la formation d'un éne-diol entre les carbones 1 et 2 de la glycosylamine N-substituée. Puis, un réarrangement conduit à une double liaison 2,3 et à la désamination du carbone 1. Ce produit intermédiaire est aussi une réductone participant à la dégradation de STRECKER. La perte d'une molécule d'eau donne un composé dicarboylé insaturé qui, par cyclisation, amène aux furfuraldéhydes, tels que l'hydroxyméthyl furfural (**Ledl et al., 1990**).

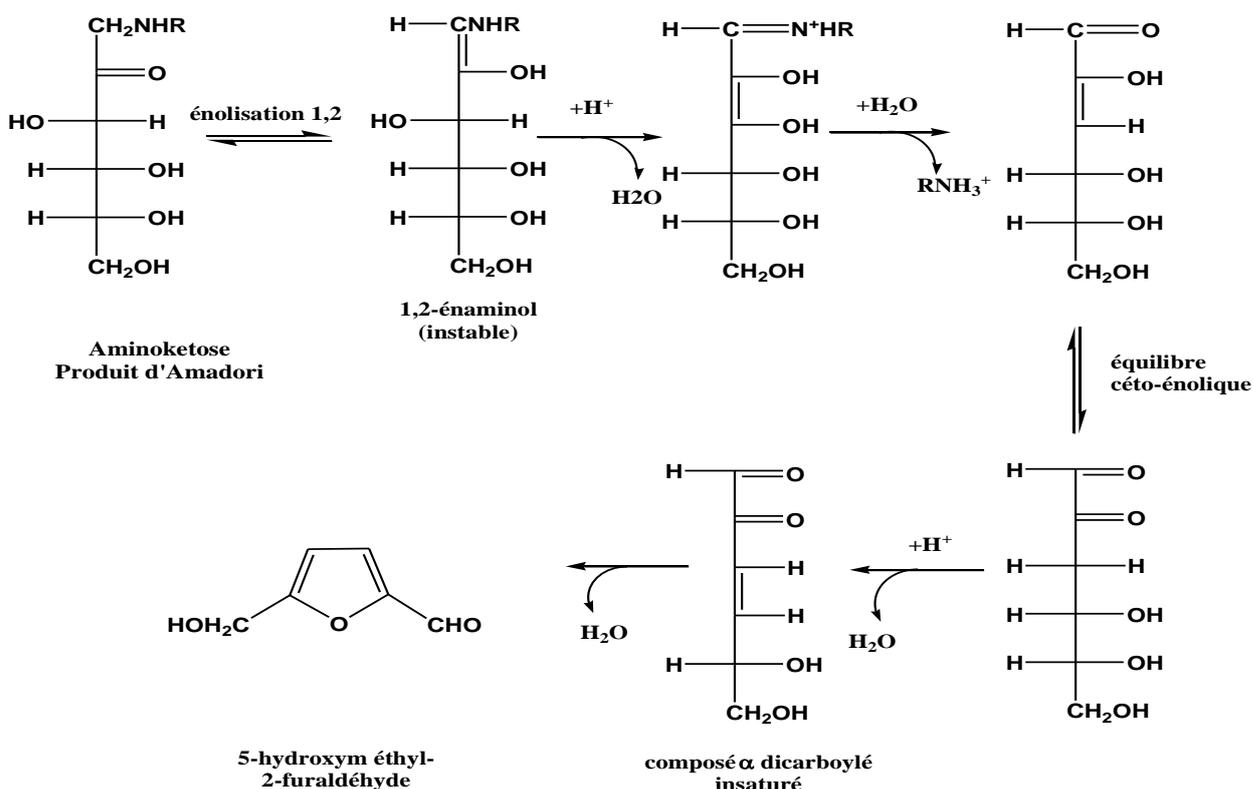


Figure I.3 : Seconde étape avancée de la réaction de Maillard, déshydratation forte (**Ledl et al., 1990**).

Ces deux premières voies sont suivies par la dégradation de STRECKER. Cette réaction est autocatalytique dans le sens où les réductones réagissent avec les acides aminés selon le même schéma que la réaction initiale de Maillard (**Figure II.4**). Ainsi, elle provoque un dégagement de CO₂, pouvant former des mousses dans les produits à

longue durée de conservation ; elle libère un aldéhyde pouvant même réagir et par désamination elle régénère la réductone qui augmente considérablement le brunissement (Ledl *et al.*, 1990).

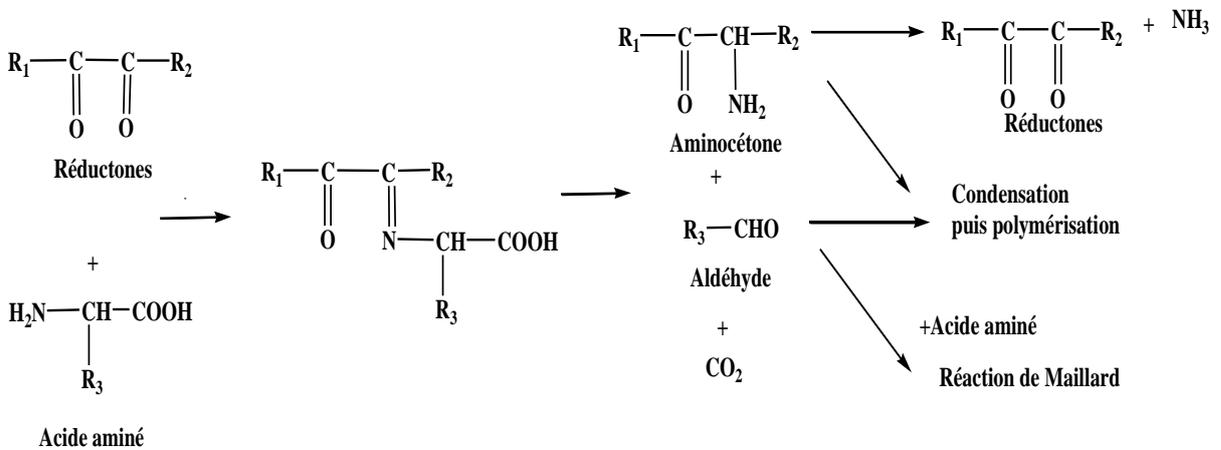


Figure I.4 : Seconde étape de la réaction de Maillard, dégradation de STRECKER ou décarboxylation oxydative et désamination des acides aminés (Ledl *et al.*, 1990).

II.3 Etape finale

Les composés obtenus lors des réactions précédentes donnent dans cette étape finale:

- par scission : des produits volatils et odorants ;
- par condensations aldoliques : des mélanoidines.

– Réactions de scission :

Une coupure des cétosamines et des aldosamines obtenus lors du réarrangement d'Amadori ou de Heyns peut conduire à la formation de molécules carbonylées ou acides de plus faibles poids moléculaires, qui, par condensation aldolique, donnent des polymères et des composés d'arômes qui ne relèvent pas spécifiquement de la réaction de Maillard puisqu'ils apparaissent également dans les réactions de caramélisation (Cheriot, 2007) .

– Réactions de polymérisation :

Elles font principalement intervenir des condensations aldoliques entre les produits intermédiaires issus des réactions précédentes et aboutissent à la formation de composés colorés de masse moléculaire élevée, entre 5 000 et 50 000 Daltons.

La structure et les mécanismes de formation des mélanoïdines ne sont pas très bien connus. Il y a trois principales propositions de structures des mélanoïdines. Il a été d'abord pensé que les mélanoïdines étaient exclusivement obtenues par polycondensations de molécules de faible masse moléculaire et consistaient en la condensation d'unités répétitives de dérivés pyrroles et/ou furannes formés lors des premières étapes de la réaction de Maillard (**Tressl *et al.*, 1998**). Cette dernière proposition est contredite par **Cämmerer *et al.*, (2002)** qui ont identifié des structures glucidiques intactes par hydrolyse acide de mélanoïdines.

Ceci indique que les glucides peuvent ne pas être dégradés en hétérocycles (furannes et pyrroles) et former des mélanoïdines. La condensation de deux aminocétones, produits secondaires de la réaction de STRECKER, donne des pyrazines, composés d'arômes très actifs. Elles sont très présentes dans les produits alimentaires auxquels elles donnent des arômes particuliers plus ou moins désirables. D'après **Bailey *et al.*, (2000)**, les réductones donnent également, par réaction avec des acides α -aminés puis par de multiples réactions intramoléculaires, des composés très colorés.

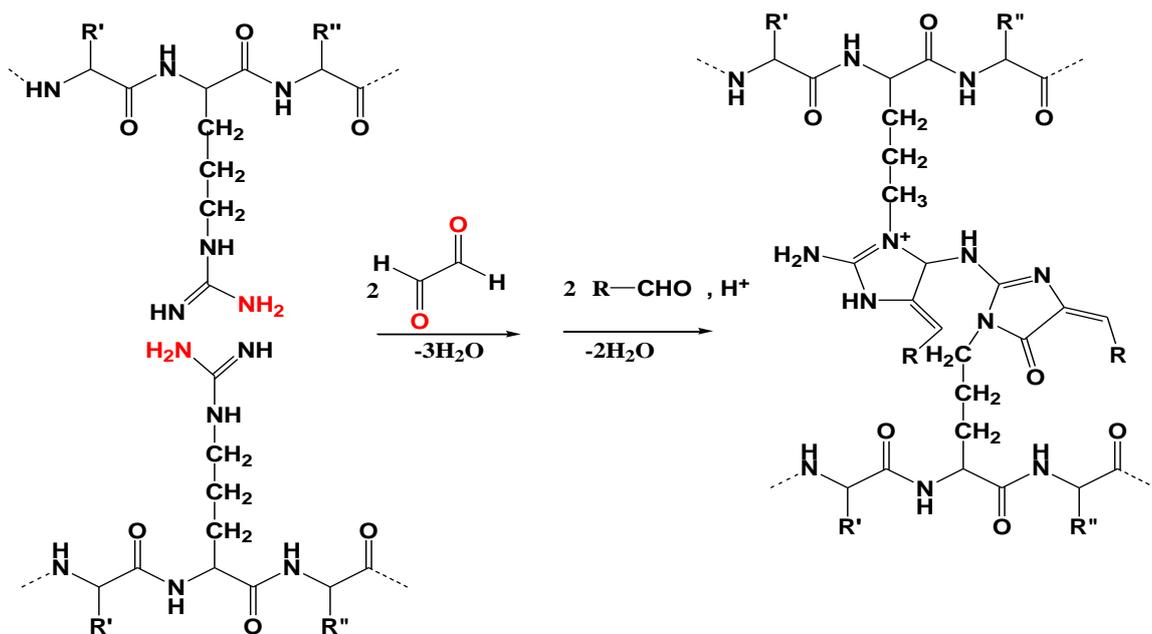


Figure I.5 : Synthèse de mélanoïdines à partir de réductones et de résidus d'arginine (D'après **Hofmann, 1998**).

Hofmann (1998), en chauffant des solutions aqueuses de glucose et d'acides aminés, a détecté la présence de composés de masse moléculaire inférieure à 3 000 Daltons capables de se lier aux protéines *via* les groupes ϵ -aminés de la lysine ou de l'arginine et produire ainsi des mélanoidines de masse moléculaire élevée (supérieure à 100 000 Daltons) (**Figure II.5**).

Les mélanoidines qui constituent les pigments bruns des aliments sont donc produites dans la troisième et dernière étape de la réaction de Maillard. Il s'agit de polymères bruns, de haut poids moléculaire qui contiennent des furanes et de l'azote et qui peuvent contenir des groupes carbonyle, carboxyle, amine, amide, pyrrole, indole, ester, anhydride, éther, méthyle et/ou hydroxyles (**Ledl *et al.*, 1990 ; Tressl, 1998**). Leur formation est le résultat de la polymérisation de composés très réactifs produits au cours de la deuxième étape et spécialement des composés carbonylés insaturés et le furfural. La polymérisation de ce dernier en présence d'amines donne des pigments bruns insolubles dans l'eau. En plus de leur contribution à la couleur brune des aliments, ces réactions de polymérisation participent au durcissement des aliments cuits et stockés. La température et le temps de réaction, le pH et l'humidité du milieu, la présence de métaux, d'oxygène et d'inhibiteurs ainsi que la nature et la concentration des différents réactifs influencent la vitesse de la réaction de Maillard (**Machiels, 2002**).

III. Facteurs influençant la réaction de Maillard

III.1 Facteurs réactionnels

a) Activité de l'eau

La réaction de brunissement non enzymatique se développe de façon intense lorsque la teneur en eau est faible avec un maximum pour des activités de l'eau comprises entre 0,55 et 0,75. En effet, aux fortes teneurs en eau, de fait de la loi d'action des masses, la première étape de la réaction étant une déshydratation, l'effet de dilution entraîne une limitation de la réaction.

b) Température et la durée de chauffage

La température de chauffage est un paramètre qui influence la cinétique de réaction et le type de produits formés. Les énergies d'activation des différentes étapes

du brunissement non enzymatique varient selon les auteurs en fonction des gammes de températures mises en œuvre et la façon de mesurer l'intensité de la réaction de Maillard. Ainsi, pour **Barbenti et al., (1990)**, la vitesse de la réaction est multipliée par deux et par cinq lorsque la température d'un mélange équimolaire de glucose / glycine est augmentée de 10 et 20 °C respectivement dans une plage de température comprise entre 70 et 90 °C. **Alais et al., (1987)** indiquent que la vitesse de disparition de l'azote est multipliée par 20 000 lorsque la température passe de 0 à 70 °C. **Anese et al., (1998)**, en mesurant le dégagement de CO₂ et l'absorbance (294 nm et à 420 nm) ont confirmé que la réaction de Maillard s'intensifie lorsque la température et la durée de chauffage augmentent.

Des mesures de l'intensité de la réaction de Maillard (mesures spectrophotométriques ou dosages d'acides aminés résiduels) ont montré que la réaction de Maillard n'est pas totalement stoppée aux basses températures (inférieures à 40 °C) et se produit *in vivo*. Les recherches actuelles sur la réaction de Maillard *in vivo* tendent à comprendre les pathologies liées au vieillissement (**Gerrard, 2006**).

c) pH du milieu réactionnel

Plusieurs études montrent une acidification au cours de la réaction de Maillard. Ceci s'explique par la formation de composés aminés de pKa plus faibles et par la transformation d'oses en dérivés acides au cours du brunissement non enzymatique (**Apriyantono et al., 1990 ; Renn et al., 1997**).

La réaction de Maillard est favorisée par des milieux alcalins, avec un optimum à pH 10 (**Ajandouz et al., 1999**). L'étude de **Renn et al., (1997)** montre que le taux de réaction du glucose augmente lorsque le pH augmente. La protonation de la fonction amine, à pH inférieur au pKa du composé aminé est souvent évoquée pour expliquer l'effet du pH sur la vitesse de réaction : la nucléophilie de la fonction amine est diminuée par la protonation. Mais cet effet du pH sur la vitesse de la réaction dépend également des autres paramètres réactionnels (**Clotet et al., 1994**).

En général, les milieux acides favoriseront plus les réactions d'hydrolyse, de déshydratations et de réarrangements, alors que les milieux basiques privilégieront les réactions d'addition et les rétroaldolisations (**Figure II.6**). Les milieux neutres seront par contre plus favorables aux réactions radicalaires. Enfin, on remarque que la

production de composés soufrés est plus importante autour du pH de 5,1, ce qui correspond au point isoélectrique (pI) de la cystéine (**Richard, 2003**).

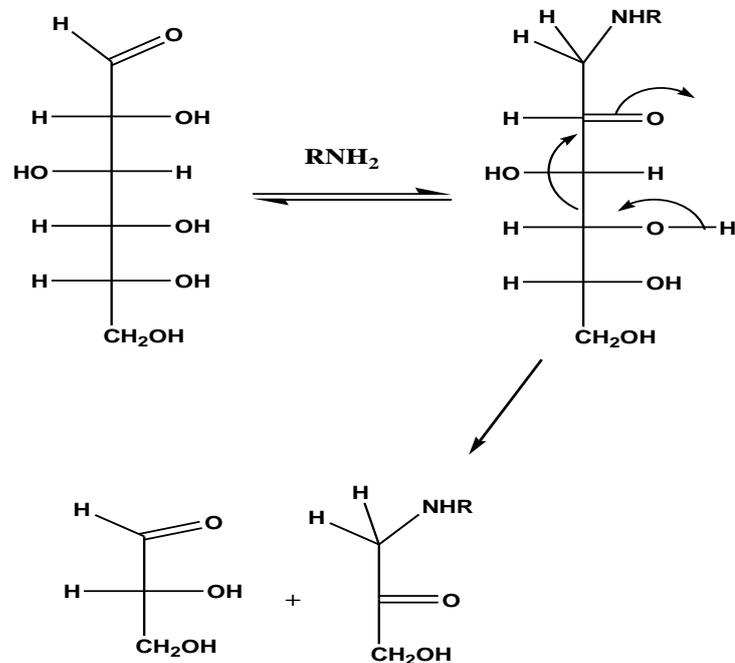


Figure I.6 : Réaction de rétroaldolisation (Richard, 2003).

III.2 Réactants

a) Nature des sucres réducteurs

Buera *et al.* (1987) ont établi une première classification des oses selon leur réactivité dans la réaction de Maillard. En chauffant des systèmes équimolaires ose / glycine à 55 °C et en mesurant l'absorbance à 420 nm des différents systèmes modèles après chauffage, il apparaît que les pentoses sont plus réactifs que les hexoses, eux-mêmes plus réactifs que les diholosides. Le saccharose, bien qu'étant un sucre non réducteur, subit également la réaction de Maillard. En effet, il est hydrolysé lors du chauffage. Le glucose et le fructose ainsi libérés peuvent ensuite intervenir dans la réaction de Maillard.

Si cette classification de réactivité des oses est généralement admise et vérifiée, d'autres paramètres peuvent influencer ce classement comme notamment le pH et la température (**Lievonen *et al.*, 2002**).

b) Nature de l'acide aminé

Lorsque la source aminée est de nature protidique, les glucides réducteurs ne peuvent réagir que sur les fonctions aminées libres, c'est-à-dire l'acide aminé N-terminal et/ou les fonctions amines latérales des acides aminés basiques (lysine, arginine, histidine). Cependant, les fonctions ϵ -aminés sont moins réactives que les α -aminés (**Adrian, 1999**).

Il paraît difficile de dresser une relation structure/réactivité des acides aminés. Des acides aminés basiques peuvent avoir des réactivités très différentes. Par ailleurs, en considérant la vitesse de disparition de l'acide aminé, **Ajandouz et al., (1999)** ont montré que la thréonine qui développe un faible brunissement est l'acide aminé le plus réactif après la lysine. Ces mêmes auteurs ont également souligné l'influence du pH sur la réactivité de l'acide aminé : cette dernière est élevée lorsque le pH réactionnel est proche du pKa du groupement aminé. Ainsi à pH 9, la lysine, l'arginine et la thréonine ont une réactivité comparable.

Selon **Richard et al., (1951)**, plus la fonction amine est éloignée de la fonction acide carboxylique, plus le caractère basique est marqué entraînant une meilleure réactivité, notamment aux premiers stades de la réaction de Maillard. Ce phénomène se traduit par l'ordre de réactivité suivant : lysine > arginine > acide glutamique > proline.

c) Influence du ratio ose / acide aminé

Barbenti et al., (1990) ont déterminé par colorimétrie, les valeurs des constantes de vitesse de la réaction entre le glucose et la glycine chauffés à 70, 80 et 90 °C. En faisant varier la concentration totale en réactants (20, 30, 40 %) et le ratio molaire glucose / glycine (1:1 ; 2:1 ; 5:1), ces auteurs montrent que la constante de vitesse de la réaction augmente lorsque la concentration totale augmente mais diminue lorsque l'excès de glucose augmente. De même, **Renn et al., (1997)** ont observé un brunissement plus rapide lorsque un excès d'acide aminé est utilisé.

d) Activateurs et inhibiteurs

En général, on peut considérer que les métaux sont favorables au développement de réactions de Maillard, accélérant en particulier les phénomènes d'oxydation. Par

contre, tous les composés susceptibles de réagir avec les fonctions carbonyles ou amines seront des inhibiteurs des réactions de Maillard retardant l'apparition des produits colorés. Tel est le cas des sulfites et en particulier du SO₂ qui sont de bons agents bloquant des fonctions aldéhydes et cétones (**Richard, 2003**).

IV. Propriétés des produits de la réaction de Maillard

Les produits de la réaction de Maillard donnent aux aliments des propriétés telles que la couleur, l'arôme, la valeur nutritionnelle et une certaine stabilité au cours de la conservation grâce à leur pouvoir antioxydant.

La couleur est due aux mélanoidines qui donnent la couleur brune caractéristique d'un grand nombre d'aliments, tels que le café, le cacao torréfiés et la croûte du pain.

L'arôme et le goût sont dus à deux familles de substances résultantes de la réaction de Maillard :

- Les furaldéhydes et les réductones formés par déshydratation des cétosamines ;
- Les aldéhydes obtenus après la dégradation de STRECKER (**Hong *et al.*, 2016**).

V. Applications de la réaction de Maillard

La réaction de Maillard a été utilisée depuis de très nombreuses années pour produire des aliments qui paraissent attractifs pour les consommateurs ; et ce aussi bien au niveau de l'apparence et que des saveurs.

L'industrie agroalimentaire applique la réaction de Maillard à de nombreux processus de transformation des aliments de manière à fournir aux consommateurs les saveurs et les couleurs qu'ils désirent. Pour ce faire, il est indispensable de pouvoir contrôler les réactions qui les forment. Selon les conditions employées, la réaction de Maillard peut conduire à la formation de couleurs ou à une décoloration ; elle peut favoriser la formation de saveurs agréables ou bien rances, la production de composés antioxydants ou de composés toxiques ou encore elle peut réduire la valeur nutritionnelle des aliments et éventuellement conduire à la formation de substances cancérigènes (**Bastos *et al.*, 2015**).

Les propriétés antioxydantes des produits de la réaction de Maillard sont peu comprises jusqu'à présent. Elles peuvent être dues à la formation de structures de type

phénols et/ou aux propriétés chélatantes des mélanoidines. Il n'est pas évident de savoir si les mélanoidines sont des agents cancérigènes ou anticancérigènes. Il semble que les propriétés anticancérigènes des mélanoidines peuvent être associées à leurs propriétés antioxydantes (Ames, 1988). Ledl *et al.*, (1990) rapportent l'hypothèse que des réactions impliquant des radicaux oxygène contribuent à piéger ces radicaux et les transforment en composés moins agressifs.

La croissance des animaux nourris avec des protéines préalablement chauffées en présence de sucres peut être retardée. Plusieurs études ont mis en évidence la réduction de la valeur nutritionnelle des protéines chauffées en présence de sucres (Jiang *et al.*, 2012 ; Martins *et al.*, 2000 ; Oliver *et al.*, 2006). La compréhension de la réaction de Maillard n'est donc pas seulement indispensable pour les procédés traditionnels de cuisine tels que le rôtissage ou la cuisson au four mais aussi pour le développement, par exemple, de nouvelles technologies utilisées pour la production d'aliments destinés aux fours à microondes.

Lors du développement de nouveaux produits, il est prépondérant de chercher à trouver le meilleur compromis entre les effets favorables et défavorables de la réaction de Maillard. Il peut s'agir de minimiser les pertes nutritionnelles en obtenant une saveur optimale lors du traitement thermique de céréales par exemple, ou encore de maximiser la production d'antioxydants en minimisant la production de saveurs et de couleur lors du traitement thermique du lait (Machiels, 2002).

VI. Réaction de Maillard *in vivo*

Il vient d'être rappelé que la chimie de la réaction de Maillard ainsi que ses implications dans les aliments ont fait l'objet d'investigations depuis des décennies. Par contre, l'étude *in vivo* des relations entre cette réaction et certaines maladies ou le vieillissement a seulement été entreprise depuis une vingtaine d'année (Friedman, 1996). L'hémoglobine et l'albumine peuvent subir des fructosylations qui se passent essentiellement sur le groupe amine des lysines faisant partie de la protéine. L'effet de ces fructosylations se marque au niveau du fonctionnement des protéines. C'est ainsi que les groupes aminés des lysines jouent un rôle important dans les interactions entre hormones, entre anticorps et antigènes, entre enzymes et inhibiteurs (Machiels, 2002).

Par exemple, l'hémoglobine des diabétiques présente un taux de fructosylation deux à trois fois plus élevé que chez les individus normaux. Le cristallin accumulait, avec l'âge, des pigments fluorescents jaunes/bruns. Il a été suggéré que des produits de la réaction de brunissement non-enzymatique pourraient être responsables du développement de ces pigments dans le cristallin (**Yaylayan, 1992**).

La réaction de Maillard apparaît également comme intervenant dans les processus de lente dégradation de molécules telles que le collagène. L'application des connaissances acquises dans le domaine de la chimie alimentaire aux études *in vivo* et *vice et versa* devrait conduire à des développements intéressants aussi bien en chimie des aliments qu'en médecine (**Machiels, 2002**).

CHAPITRE II :
PARTIE EXPÉRIMENTALE.

I. Produits utilisés

Hormis la gélatine de grade pharmaceutique sous forme de poudre (Type A, Bloom 300) (Sigma-Aldrich) ; l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) ($C_6H_3N_3O_9S$), MM=293,17g/mol (Sigma-Aldrich) ; l'acide bicinchoninique (BCA) ($C_{20}H_{12}N_2O_4$) MM=344,32g/mol (Sigma-Aldrich) et l'albumine de Sérum bovin (BSA), MM=66,430g/mol, PI=4,7 (Sigma-Aldrich), tous les réactifs et produits chimiques utilisés lors de cette étude sont déjà cités dans la section précédente (voir pp.25).

II. Méthodes

II.1 Préparation des films

Des films à base d'alginate/gélatine (50/50) (m/m) (%) ont été préparés selon la méthode décrite par **Su et al., (2010)** mais après introduction de quelques modifications. Au départ, la réaction de Maillard a été étudiée à partir des solutions préparées de gélatine et de NaAlg en suivant trois étapes à différents pHs et températures.

(1) La solution aqueuse de gélatine (solution A) a été obtenue à 5% en poids dans de l'eau bi-distillée. Le pH a été ajusté à environ 7, 8, 9, 10 ou 11 avec $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. Le tout est placé sous une faible agitation pour éviter la formation des bulles d'air à $T = 70^\circ\text{C}$ pendant 30 min.

(2) La solution aqueuse de 5 % en poids de NaAlg (solution B) a été préparée séparément sous agitation pendant 30 mn à $T = 70^\circ\text{C}$.

(3) La solution A a été mélangée à la solution B dans un rapport de (1/1) (V/V). Les différents pHs sont ajustés ensuite à 7, 8, 9, 10 ou 11 avec du NaOH ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$). Le chauffage est maintenu à 70°C dans d'un bain marie sous agitation

Ensuite, les solutions obtenues sont versées dans des boîtes de Pétri en polystyrène (9,5 cm de diamètre) et sont laissées sécher à l'air libre pendant 3-4 jours. L'épaisseur des films avant et après le séchage sont 0,6 mm et 0,12 mm, respectivement.

La même procédure décrite ci-dessus a été appliquée à T=80°C et à T=90°C. Les échantillons sont codés comme il est illustré dans le tableau suivant :

Tableau II.1 : Codes utilisés pour les différents échantillons en fonction des conditions de préparation.

pH \ T(°C)	7	8	9	10	11
70	AG70-7	AG70-8	AG70-9	AG70-10	AG70-11
80	AG80-7	AG80-8	AG80-9	AG80-10	AG80-11
90	AG90-7	AG90-8	AG90-9	AG90-10	AG90-11

II.2 Identification et caractérisation

II.2.1 Mesure du pH

Les pHs des solutions alginate/gélatine ainsi préparées ont été suivis au cours du temps de la réaction. Le suivi du pH a été réalisé à l'aide d'un pH-mètre. Les valeurs de pH ont été enregistrées dans un intervalle de temps de 30 min.

II.2.2 Intensité de brunissement

Les intensités de brunissement des solutions ont été déterminées en suivant la méthode décrite dans la littérature (**Carabasa *et al.*, 2000 ; Laroque *et al.*, 2008**) par UV-VIS.

Elles ont été étudiées à partir des solutions préparées aux différents pH (pH=7, 8, 9, 10 et 11). Le spectrophotomètre utilisé est de type UNICAM-UV-VIS 300 (USA). L'enregistrement des spectres s'est fait au cours du temps de la réaction dans des intervalles de 30 min.

II.2.3 Détermination du nombre de moles des ϵ -amino groupes par le TNBS

L'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) a été utilisé pour déterminer le nombre de groupements amines 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. Nous avons suivi la méthode décrite par **Bubnis *et al.*, (1996)** et **Biji *et al.*, (2001)**. La réaction est représentée comme suit : **(Figure II.1)**

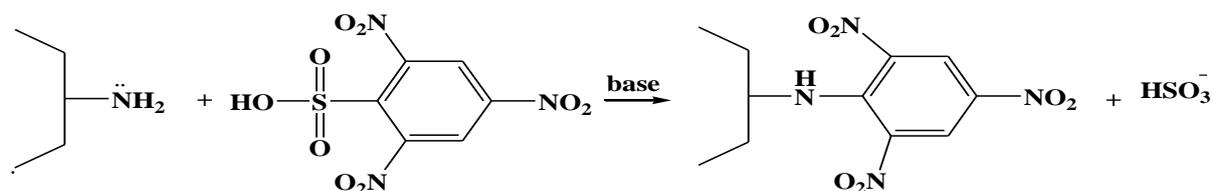


Figure II.1: Réaction de l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique avec les groupements amino libres de protéines en milieu alcalin (**Bubnis, 1992**).

Pour la réalisation de ce test, dans un ballon de 250 mL, nous avons mélangé 11mg du film avec 1mL de NaHCO₃ (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. L'extraction est faite avec 5 mL d'éther éthylique (x3fois) pour éliminer l'excès de TNBS restant ainsi que les groupes α -aminés de trinitrobenzène qui n'ont pas réagi.

Puis, 5mL de la phase aqueuse sont prélevés et chauffés pendant 15min dans un bain-marie afin d'évaporer l'éther résiduel. Après nous avons additionné 15 mL d'eau à la phase aqueuse. L'absorbance est lue à une longueur d'onde égale à 346 nm. L'appareil utilisé est un spectrophotomètre de type UNICAN-UV-VIS 300.

L'équation suivante (**Dubois, 2006, Biji *et al.*, 2001**) nous a permis de déterminer le nombre de moles des groupes ϵ -amino par gramme de gélatine:

$$\frac{\text{Nombre de moles de groupes amines}}{\text{Gramme de gélatine}} = \frac{2(\text{Absorbance})(0,02 \text{ litres})}{(1,46 \times 10^4 \text{ litre/mole.cm})(b)(x)}$$

Avec :

1,46 x 10⁴ litres moles⁻¹ cm⁻¹ : L'absorptivité molaire du TNP-lys (2,4,6-trinitrophényllysine).

b : L'épaisseur de la cuve de mesure (cm).

x : La masse de l'échantillon (g).

Le degré de réticulation est directement calculé à partir de l'équation suivante :
(OfnerIII *et al.*, 1996)

$$\text{Degré de réticulation (\%)} = \frac{[1 - \text{absorbance du film après réaction}]}{\text{absorbance du film avant réaction}} \times 100(\%)$$

II.2.4 Dosages chimiques

II.2.4.1 Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)

Les films à 0,5g de masse ont été plongés dans 25 mL d'eau distillée et placés dans des boîtes de pétri en verre à T_{amb} . Puis, 100 μ l des solutions ont été prélevés dans un intervalle de temps de 10 min pour le dosage des protéines. La concentration en protéine dans les solutions prélevées a été déterminée par dosage colorimétrique en utilisant un kit de dosage de l'acide bicinchoninique nommé « *Working* ».

La solution de dosage « *Working* » a été préparée en mélangeant une solution de sulfate de cuivre (II) CuSO_4 à 4% avec un excès d'acide bicinchoninique à un rapport final de 1/50 (V/V).

Un volume de 100 μ L des solutions prélevées a été ajouté à 2 mL de la solution de dosage «*Working*» dans des tubes à essai. Après, les tubes à essais ont été placés dans un bain marie à température égale à 37°C pendant 30 minutes. L'absorbance UV-VIS des solutions de chaque tube a été mesurée à 562 nm en utilisant un spectrophotomètre. La concentration en protéines dans les solutions de libération a été déterminée par rapport à la courbe d'étalonnage. Cette dernière a été construite en suivant la démarche suivante :

Le kit comprend une ampoule de l'acide bicinchoninique (BSA) à une concentration de 1000 μ g/mL (solution mère). Cette protéine (BSA) nous a servi comme référence pour l'établissement de la courbe d'étalonnage. Pour ce faire, cinq tubes à cinq concentrations différentes en BSA ont été préparés comme suit :

Tube 1: 0,1mL de BSA (1000 $\mu\text{g/mL}$) +2 mL de la solution «Working».

Tube 2: 0,1mL de BSA (800 $\mu\text{g/mL}$) +2 mL de la solution «Working».

Tube 3: 0,1mL de BSA (400 $\mu\text{g/mL}$) +2 mL de la solution «Working».

Tube 4: 0,1mL de BSA (200 $\mu\text{g/mL}$) +2 mL de la solution «Working».

Tube 5: 0,1mL de l'eau distillée +2 mL de la solution «Working».

Les tubes ainsi préparés sont placés dans un bain marie à 37°C pendant 30 min. Puis, on les laisse retourner à la température ambiante. L'absorbance est lue à une longueur d'onde égale 562 nm. Le tracé de la courbe d'étalonnage donne une droite (Figure II.2).

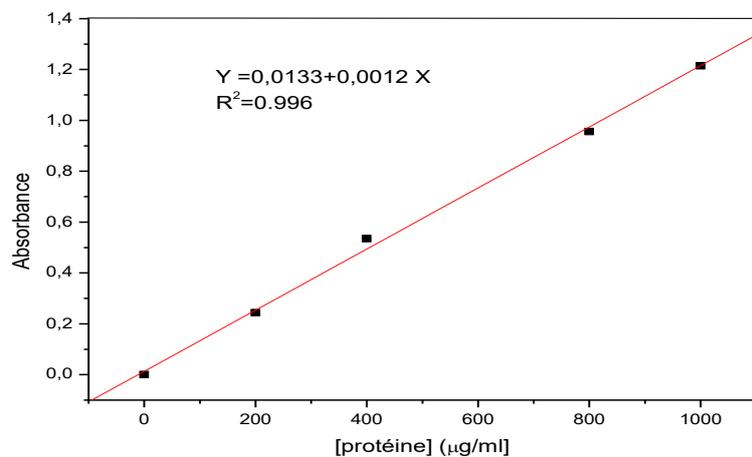


Figure II.2. Courbe d'étalonnage à $\lambda_{\text{max}}=652$ nm pour la détermination de protéines libérées à partir des films.

II.2.4.2 Détermination des groupes aminés libres par titrage pH-métrique

Les nombres des groupes amines portés par la gélatine et les mélanges gélatine-alginate sont quantifiés par le titrage pH métrique en suivant la méthode décrite par (Gómez-Mascaraque *et al.*, 2014).

Au départ, 25 mL d'une solution de HCl (0,1N) sont ajoutés à 0,1 g du produit à étudier. L'agitation est maintenue ensuite pendant 24 h. Puis, la solution est titrée avec une solution de NaOH (0,1N). Le pH est enregistré lors du titrage et l'agitation est au moins laissée pendant de 2minutes après addition de NaOH pour s'assurer de la

déprotonation des $-NH_3^+$ liés à la gélatine. Le pourcentage de groupes amines est calculé en utilisant l'équation suivante établie par **Haffmann *et al.*, (2009)** :

$$NH_2 = \left[M_{NaOH}(V_2 - V_1) * \frac{161}{m} \right] * 100$$

Avec:

M_{NaOH} : La molarité de la solution de NaOH.

V_1 et V_2 : Les volumes pour neutralisation l'excès de HCl et la protonation de groupes amines.

161 : Le poids moléculaire de la lysine.

m : La masse de l'échantillon à l'état sec.

II.2.5 Etudes structurales

II.2.5.1 Spectrophotométrie infrarouge IF-TR :

Les spectres ont été directement enregistrés à partir des films préparés. Le type d'appareillage est donné en pp.29.

II.2.5.2 Radiocristallographie par diffraction des rayons X (DRX) (Voir partie oxydation en pp.29).

II.2.5.3 Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les mesures thermogravimétriques (ATG) sont réalisées à l'aide d'un appareil de type TGA 4000 Perkin Elmer couvrant une gamme de température allant de la température ambiante à 500°C. Un balayage de gaz inerte est assuré dans l'enceinte expérimentale qui comprend une nacelle en platine de 20 μ L. La vitesse de chauffage appliquée est 10°C min⁻¹.

II.2.5.4 Microscopie à force atomique (AFM)

(Voir section précédente, pp.30).

II.2.6 Etudes biologiques

II.2.6.1 Activité antioxydante par la méthode du DPPH

L'effet scavenger des films à base d'alginate de sodium vis-à-vis du radical DPPH est évalué selon la méthode décrite par **Jieun *et al.*, (2013)**. Un volume de 2 mL de la solution de DPPH (0,1mM) est mélangé avec 0,6 mL des solutions d'alginate de sodium et des mélanges (alginate de sodium/gélatine) (20-10 mg/mL) ou un antioxydant standard (BHT) à différentes concentrations (l'alginate est solubilisé dans l'eau). Après 30 minutes de repos à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm. Le pourcentage de l'activité anti-radicalaire est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

Avec :

A_c : Absorbance du contrôle.

A_t : Absorbance du test.

La concentration effectrice (EC) définie comme la concentration de l'échantillon qui produit 50% d'effet piègeur du radical DPPH est enfin déterminée.

II.2.6.2 Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des films est déterminé selon la méthode de **Topçu *et al.*, (2007)** en introduisant quelques modifications. Différentes concentrations de films (2-0,125 mg/mL) ou de l'antioxydant standard (BHT) (0,5-0,025 mg/mL) sont mélangées avec 2,5 mL de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 mL de ferricyanide de potassium [$K_3 Fe(CN)_6$] (1%). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 2,5mL de TCA (10%) sont ajoutés suivis de centrifugation à 3000 tours/min pendant 10 minutes.

2,5 mL de surnagent, 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL de $FeCl_3$ (0,1%) sont additionnés et l'absorbance est lue à 700 nm contre un blanc qui contient tous les réactifs à l'exception de $FeCl_3$. La valeur EC est la concentration de l'échantillon qui

correspond à une absorbance égale à 0,5 et est calculée à partir du graphe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

II.2.6.3 Activité anti inflammatoire

(Voir la section précédente, pp.32).

II.2.6.4 Activité antibactérienne

(Voir la section précédente, pp.33).

CHAPITRE III :
RÉSULTATS ET DISCUSSION.

I. Mesure du pH

Les pHs des solutions préparées ont été suivis à l'aide d'un pH-mètre au cours du temps et en fonction de la température.

Idéalement, lors de chaque expérience, le pH devrait être maintenu constant, mais ceci est expérimentalement assez difficile à des températures supérieures ou égales à 70°C. Même dans le cas de l'utilisation d'un tampon (**Martins *et al.*, 2005**). Les pHs initiaux lors de nos différentes expériences sont affectés par le temps de chauffage ; et par conséquent, les pHs baissent au fur et à mesure que la réaction de Maillard progresse dans le temps comme le montre la **figure III.1**.

Cette diminution de pHs a été aussi mentionnée dans les travaux réalisés par **Liu *et al.*, (2013)**, **Matmaroh *et al.*, (2006)** et **Martins *et al.*, (2005)**.

On remarque également qu'en plus de l'effet des pHs initiaux des solutions les températures affectent au cours des temps des réactions les pHs respectifs des milieux réactionnels, d'une part ; et d'autre part, cette atteinte est beaucoup plus prononcée aux températures et aux pHs élevés, c'est-à-dire, les diminutions de ces derniers sont beaucoup plus importantes. Prenons, par exemple, le cas où le pH est égal à 11, il diminue quand la température augmente de 70°C à 80°C puis à 90°C, respectivement jusqu'à pH=10,51 ; 9,8 et 9,4.

Par contre, cette diminution est faiblement remarquée aux températures et aux pHs initiaux moins élevés.

La diminution du pH observée pendant la réaction de Maillard pourrait être attribuée à la réaction des amines pour former des composés de basicité plus faible (**Matmaroh *et al.*, 2006**). Il a été reporté que cette diminution du pH est également liée à la formation des réductones et des mélanoidines (**Liu *et al.*, 2013**). Cela signifie qu'il y a une relation entre la formation des mélanoidines (produits de la réaction de Maillard, MRPs) et le pH du milieu. Donc, le taux de cette formation dépend fortement du pH utilisé. Plus le pH est élevé, plus ce taux est considérablement augmenté.

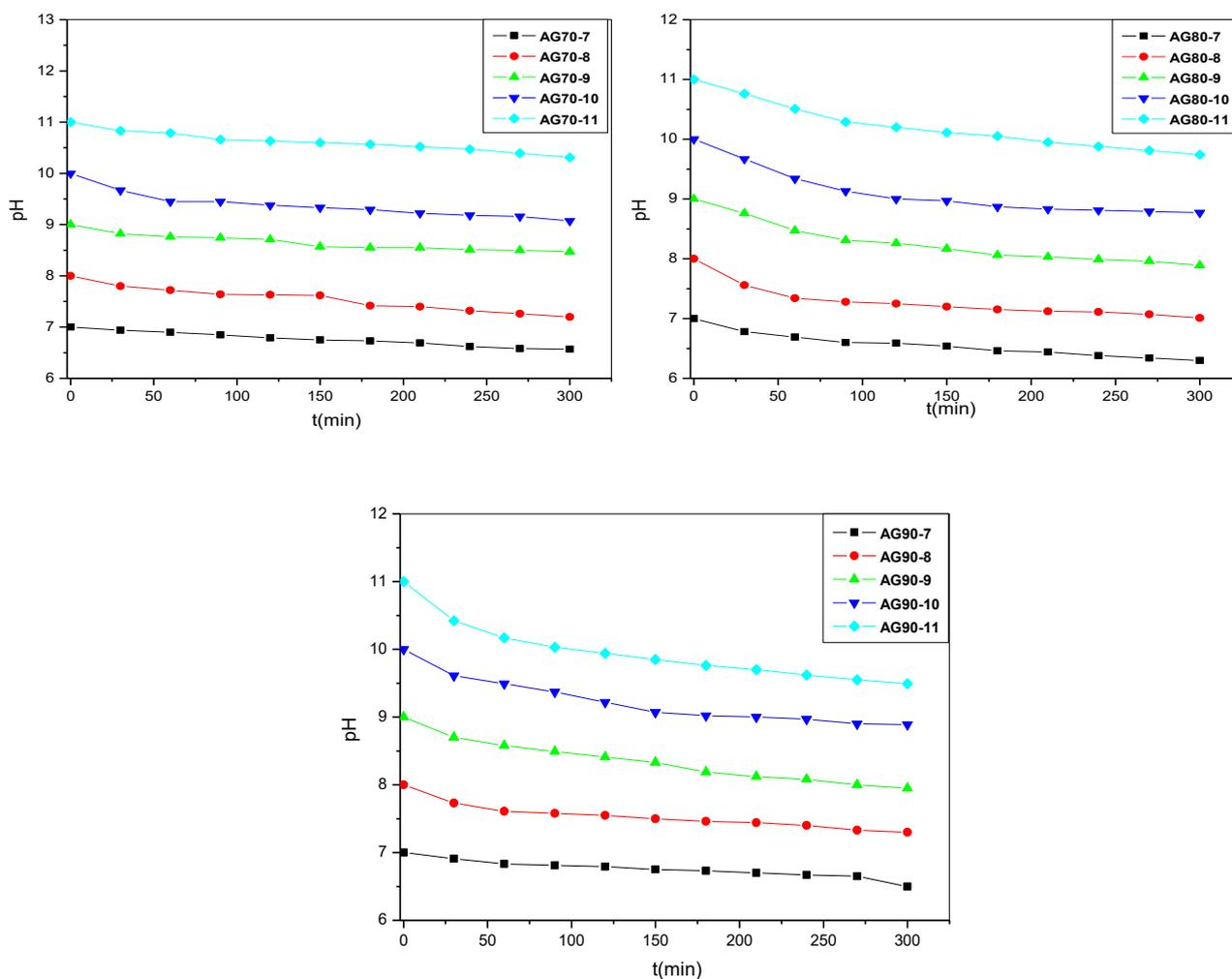


Figure III.1 : Evolutions des pHs en fonction du temps et de la température de la réaction.

II. Intensité de brunissement

La couleur brune qui se forme lors de la réaction de Maillard représente le centre d'intérêt dans la recherche dans ce domaine surtout pour déterminer les mécanismes d'évolution des réactions impliquées dans ce processus chimique.

Dans la première étape de la réaction de Maillard, le groupe carbonyle réagit avec le groupe amine donnant naissance à des composés incolores qui n'absorbent pas dans le spectre visible. La progression de la réaction de Maillard implique la production des composés appelés mélanoidines (MRPs) (Vhangani *et al.*, 2013) qui possèdent différentes valeurs d'absorbance. La couleur brune obtenue au cours de la présente étude a été utilisée comme indicateur de la réaction de Maillard. Cette étude a été menée en fonction du pH et du temps de chauffage.

➤ **Intensité de brunissement en fonction du pH**

La **figure III.2** illustre l'évolution des intensités de brunissement en fonction du pH et de la température.

De nombreux auteurs mesurent l'intensité de brunissement à travers les valeurs des absorbances qui peuvent servir d'indicateurs d'évolution de la réaction de Maillard à des stades avancés (**Oliveira et al., 2014**).

À $T = 70^{\circ}\text{C}$ (**Figure III.2 A**), le pic à 280 nm apparaît dans toutes les courbes et augmente en intensité avec le pH. De plus, un nouveau pic à 290 nm est détecté à pH égal à 11. Les mêmes résultats sont obtenus à $T = 80^{\circ}\text{C}$ (**Figure III.2 B**). Les deux pics précédemment obtenus sont observés sur tous les graphes et augmentent en intensité au fur et à mesure que le pH augmente. L'augmentation de l'intensité est influencée aussi par la température surtout à $T = 90^{\circ}\text{C}$ pour AG90-11.

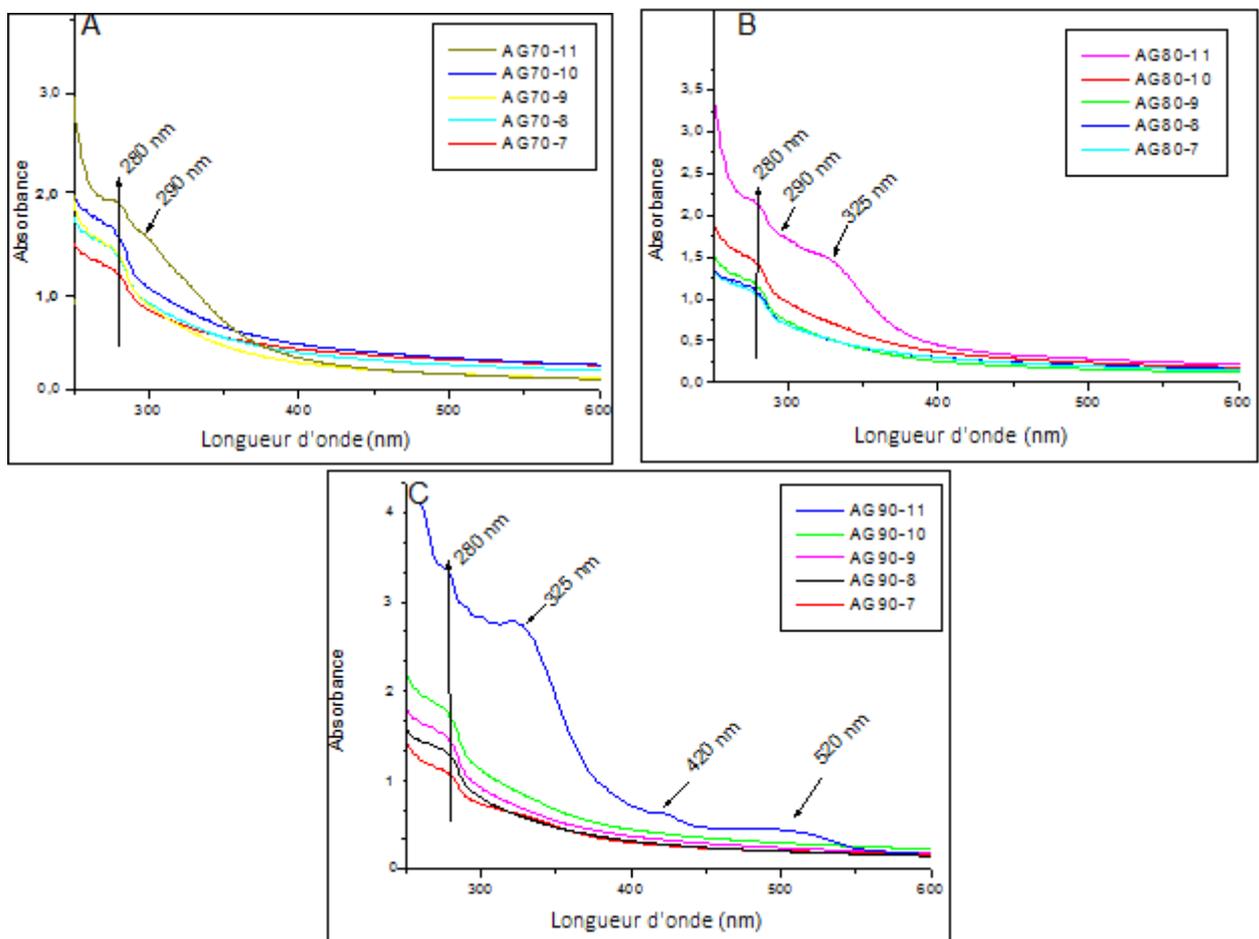


Figure III.2 : Intensités de brunissement en fonction de la température (**A :** $T = 70^{\circ}\text{C}$, **B:** $T = 80^{\circ}\text{C}$ et **C:** $T = 90^{\circ}\text{C}$) et des pHs (de 7 à 11).

L'apparition de ces deux pics peut être expliquée, selon **Liang *et al.*, (2014)**, par la formation des produits intermédiaires de la réaction de brunissement non-enzymatiques (réaction de Maillard).

De même, comme indiqué ci-dessus, à pH = 11, on note l'apparition d'un autre nouveau pic à 325 nm pour AG80-11 (**Figure III.2 B**). Il s'intensifie dans le cas d'AG90-11 (**Figure III.2 C**).

Lors de l'augmentation de l'intensité de brunissement, un pic de faible intensité à 420 nm surgit surtout dans le cas de AG90-11. Mais, seul ce dernier (**Figure III.2 C**) exhibe en plus du pic à 420 nm une autre absorption à 520 nm.

On doit préciser encore que tous ces pics sont utilisés comme indicateurs de développement du brunissement dans les dernières étapes de la réaction de Maillard (**Nursten, 2005 ; Liang *et al.*, 2014**).

➤ **Intensité de brunissement en fonction du temps de chauffage à pH=11**

La **figure III.3** montre les intensités de brunissement en fonction de la température de la réaction (70°C, 80°C et 90°C) et du temps. Chaque mesure est faite à des intervalles de temps d'une demi-heure.

Au bout de 2 heures de chauffage, il y a une augmentation de l'intensité de brunissement en fonction du temps de chauffage ; par conséquent, une augmentation des absorbances de tous les échantillons (**Figures III.3 A-C**).

Comme le montre la **figure III.3 A**, à T=70°C, l'absorbance à 280 nm augmente avec le temps de chauffage. L'absorbance à cette longueur d'onde est utilisée pour suivre le début de la réaction de Maillard (**Carabasa-Giribet *et al.*, 2000**).

Cependant, une bande d'absorption à 290 nm apparaît à T=70°C et à T=80°C (**Figure III.3 A-B**). Par contre, elle est absente à T=90°C (**Figure III.3 C**). Selon **Laroque *et al.*, (2008) ; Decourcelle *et al.*, (2010) et Riquelme *et al.*, (2015)**, cette bande est caractéristique des produits intermédiaires de la réaction de Maillard qui sont des composés colorés. Aussi, un pic à 325 nm est présent (**Figure III.3 B**) à T=80°C et s'intensifie au cours du temps, indiquant la formation des produits de la réaction de Maillard. Cette bande a également été trouvée dans les réactions de Maillard étudiées par **Kim & Lee (2008)** et **Li *et al.*, (2014)**. L'intensité de ce pic atteint un maximum à

T=90°C. Ce qui peut signifier que le taux des produits de la réaction de Maillard est plus élevé à haute température. De plus, deux nouvelles bandes apparaissent à 420 nm et 520 nm (**Figure III.3 C**) avec des intensités croissantes. C'est une indication de la formation des mélanoidines selon **Ramonaitytė et al., (2009), Li et al., (2009) & Nursten (2005)**.

Nous devons mentionner que la couleur jaune obtenue lors de notre étude est visible à l'œil nu et évolutive avec le temps. Elle devient brune et prend ensuite la couleur marron.

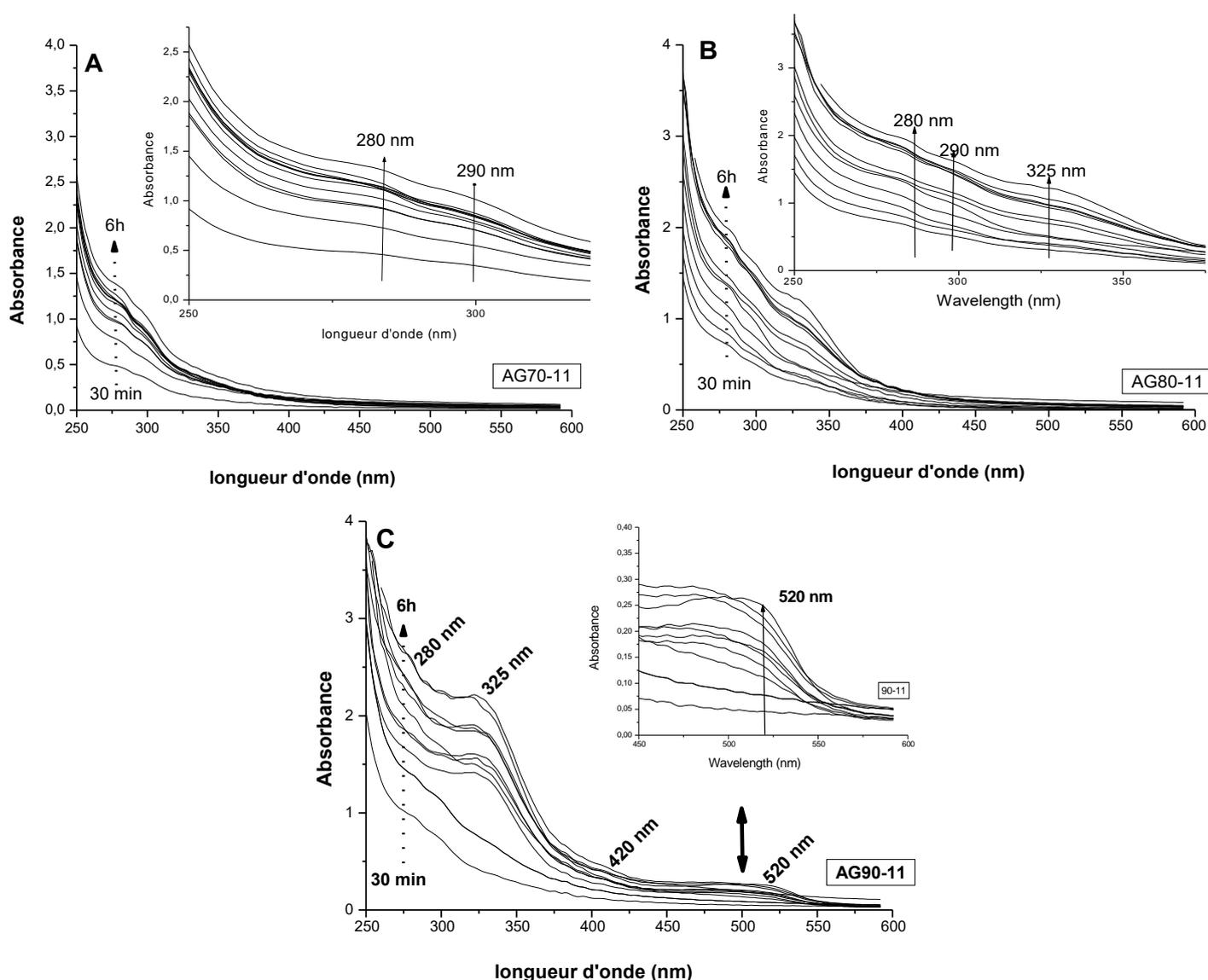


Figure III.3 : Evolution de l'absorbance au cours du temps en fonction de la température (**A** : T=70°C, **B**: T= 80°C et **C**: T= 90°C).

III. Détermination du nombre de moles des ϵ -amino groupes par le TNBS

Le TNBS est utilisé dans diverses procédures pour déterminer les amines primaires dans les peptides, les protéines et les aliments (**Bubnis & Ofner, 1992**). La production des amino-groupes est facilitée par le milieu alcalin ; et donc, dans des conditions basiques. La gélatine déprotonée devient l'espèce dominante (**Ahmad & Benjakul, 2011**).

Cette méthode de dosage des protéines par le TNBS nous permet de calculer le nombre des ϵ -amino groupes (moles/g de gélatine) et d'évaluer le taux de réticulation de la gélatine grâce à l'équation qui relie le degré de réticulation à l'absorbance. Le degré de réticulation est obtenu en déterminant la quantité de gélatine n'ayant pas réagi.

Il a été reporté selon **Bubnis et al., (1992)**, 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 $100\ 000\text{ g mole}^{-1}$, 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.

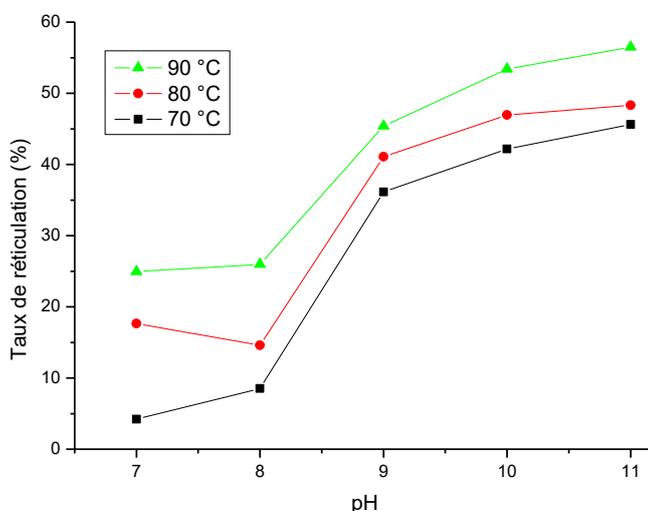


Figure III.4 : Taux de réticulation en fonction du pH et de la température.

Les résultats montrés sur **la figure III.4** indiquent que le pH = 8 était suffisant pour réticuler environ 08% des ϵ -amino groupes à T = 70°C. En outre, le degré de réticulation augmente avec le pH et de manière significative jusqu'à environ 26% lorsqu'une température élevée est utilisée. On a également observé que le degré de réticulation augmente avec la température à environ 56,5% pour AG90-11, 47,08% pour AG80-11 et 45% pour AG70-11.

IV. Dosage des protéines par l'acide Bicinchoninique (BCA)

C'est un dosage colorimétrique basé sur la formation d'un complexe absorbant à 562 nm, entre l'acide bicinchoninique et le cuivre I (Cu I), formé après la réduction du Cu II par les protéines (**Oerther, 1998**).

Comme il est montré sur la **Figure III.5**, le pourcentage de gélatine diminue lorsque le pH et la température augmentent. Par contre, ce pourcentage augmente avec le temps, sauf pour AG80-10 qui présente des valeurs plus élevées que celles de AG70-10 après t=2h (**Figure III.5 D**). De plus, pour AG80-7, le pourcentage de gélatine libérée au cours du temps est inférieur à ceux obtenus pour AG90-7 (**Figure III.5 A**). Les valeurs mesurées augmentent de 21,5% à 42% pour AG80-7 et de 23,5% à 47% pour AG90-7, mais après t = 3h, le pourcentage de gélatine libérée devient similaire (45,5%). On note également que la libération cumulative de la gélatine à pH élevé (pH = 11) est relativement faible et représente environ 9% pour AG90-11 après t=4h de stockage dans l'eau distillée. En outre, la plus grande quantité de gélatine est à environ 57% de l'échantillon étudié à 70°C (AG70-7).

La diminution de la libération de la gélatine est due non seulement à la formation d'une conformation hélicoïdale aléatoire des chaînes (**Rbii et al., 2011**), mais aussi à la réduction des interactions intra- et inter-moléculaires de la gélatine (**Zandi et al., 2017**).

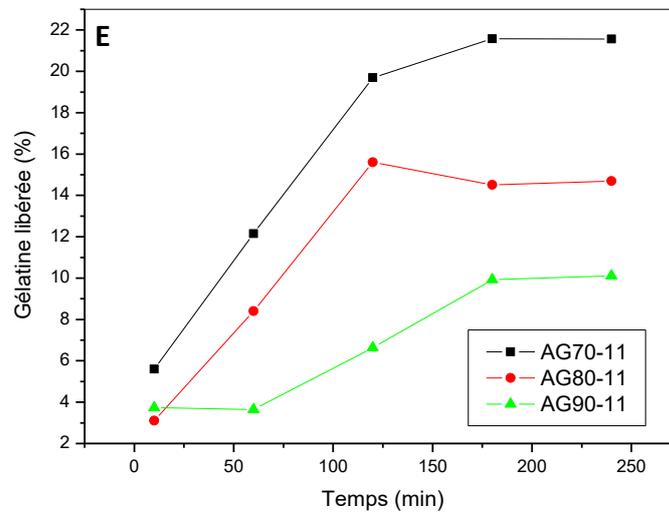
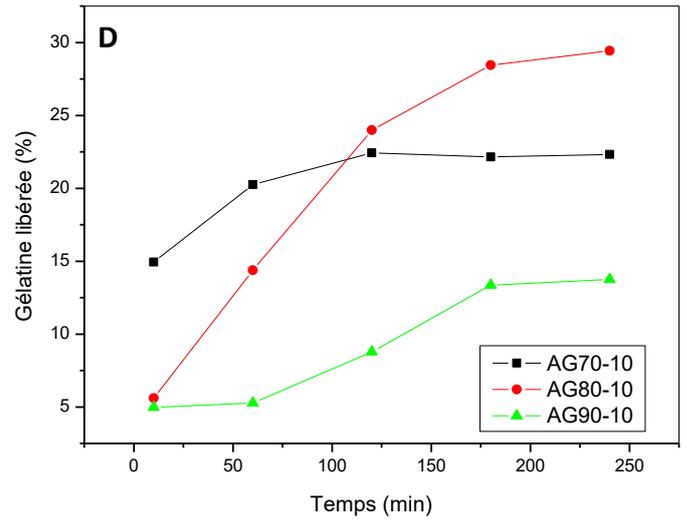
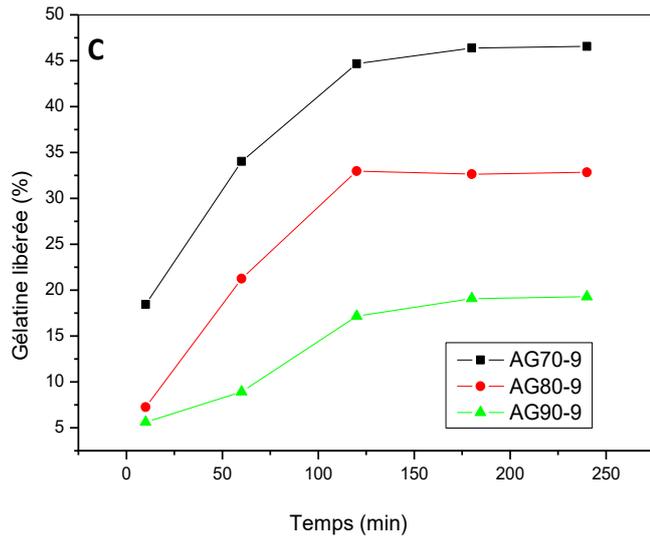
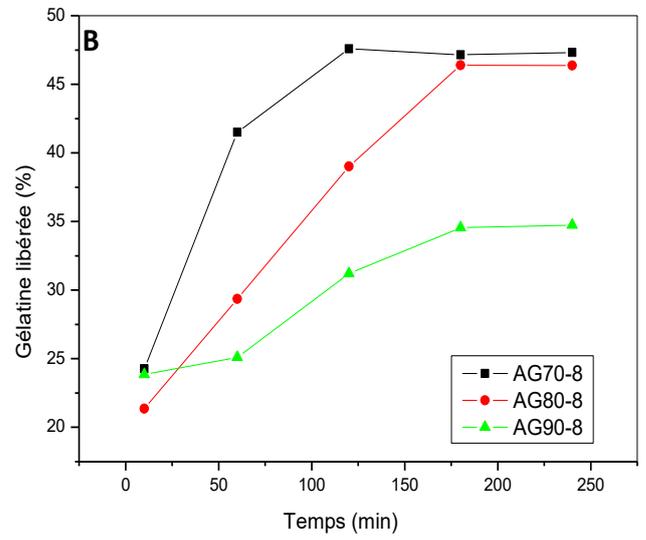
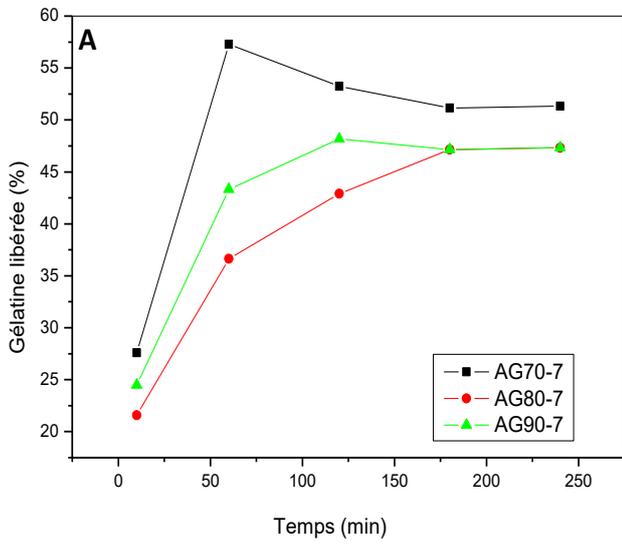


Figure III.5 : Gélatine libérée (%) en fonction du temps de stockage dans l'eau distillée, de la température et du pH (A: pH=7 ; B : pH=8 ; C : pH=9 ; D : pH=10. E : pH=11).

Ce qui favorise la proximité des fonctions réactives, comme la lysine, avec d'autres constituants de son environnement. Ainsi, la réaction entre les amino-groupes de la lysine est facilitée et conduit à la formation de liaisons intermoléculaires entre les chaînes de gélatine et l'alginate à travers la réaction de Maillard. De plus, comme le montre la **figure III.5**, cette réaction réduit considérablement la libération de la gélatine lorsque le pH augmente et confirme la stabilisation induite par l'alginate sur la gélatine. Ces résultats sont analogues à ceux obtenus par **Boanini *et al.*, (2010)** sur des films d'alginate-gélatine oxydés.

V. Détermination des amino-groupes libres

La teneur des groupements amines libres dans la gélatine avant et après réticulation avec l'alginate selon la réaction de Maillard est estimée en employant la méthode de titration du pH décrite par **Hoffman *et al.*, (2009)** et **Gomez *et al.*, (2014)**.

Les résultats sont montrés dans la **figure III.6**. L'addition de NaOH augmente les valeurs du pH. La première augmentation (entre les volumes de 0 mL et 10 mL de NaOH à 0,1N) sur la courbe de la gélatine seule est due à un excès de HCl dans le milieu réactionnel. Ici, nous sommes dans la forme protonée de la gélatine.

Dans l'intervalle des volumes de NaOH entre 10 mL et 13 mL, sur les courbes de la gélatine et d'AG70-7, les amino libres sont estimés respectivement à 37,35% et 18,41%.

Après addition à la gélatine de l'alginate, les différentes courbes (sous forme d'un S), ne montrent aucun nouveau plateau ni déviation entre le premier palier aux pHs faibles et le second palier aux pHs élevés. C'est une indication que les amino-libres de la gélatine ont réagi avec les groupes présents dans l'alginate. Des résultats similaires sont obtenus par **Hoffmann *et al.*, (2009)**.

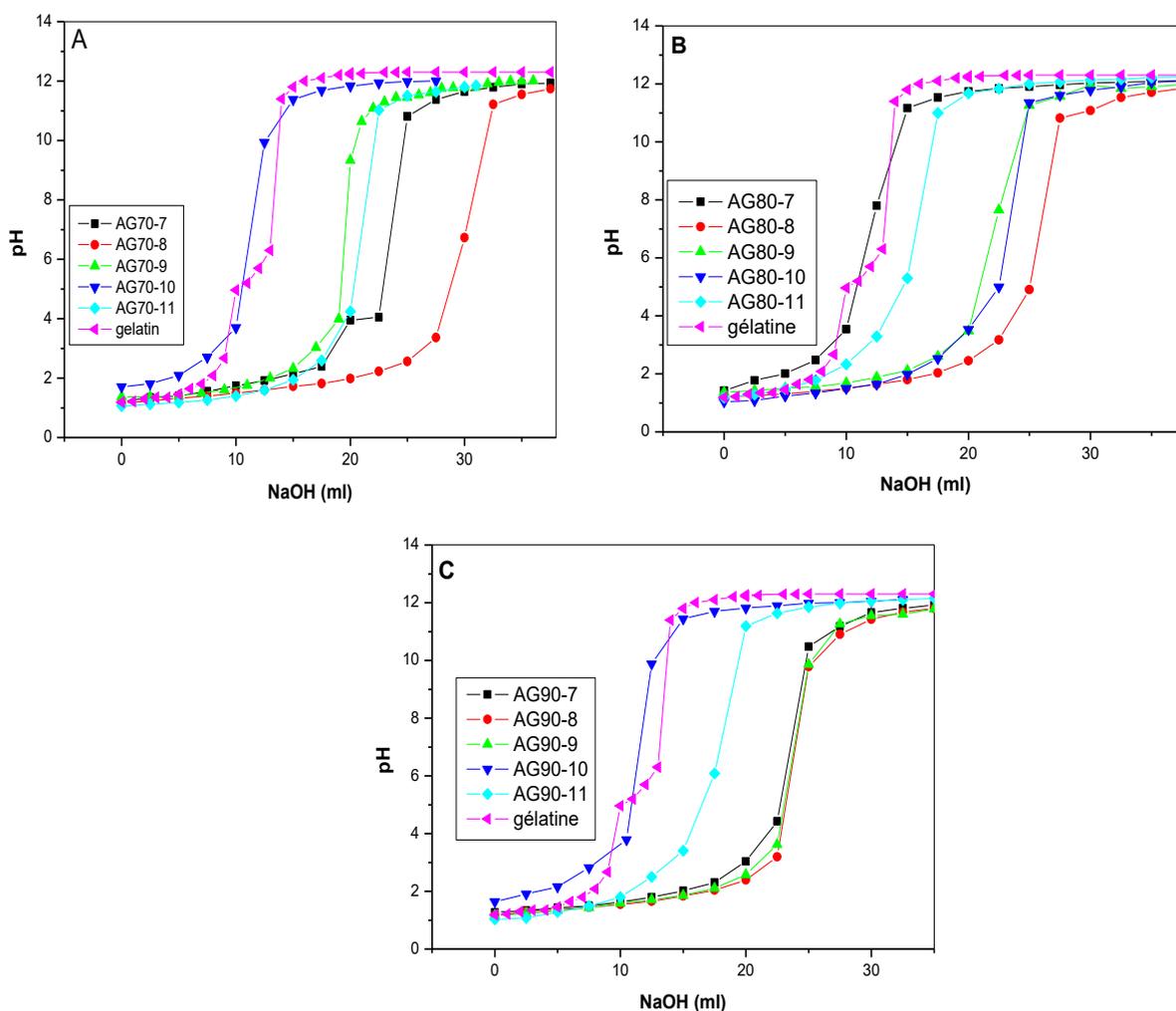


Figure III.6 : Dosage pH-métrique de la gélatine et alginate-gélatine réticulés par la réaction de Maillard (**A** : T=70°C, **B**: T= 80°C et **C**: T= 90°C).

VI. Spectroscopie IR-TF :

La **figure III.8** montre les spectres IR de la gélatine, de l'alginate, des mélanges alginate- gélatine (AG) traités à différentes température (70-90°C) et aux différents pHs (7-11). Pour l'alginate seul, deux bandes d'absorption caractéristiques à 1595 et 1410 cm^{-1} sont observées et sont attribuées respectivement aux vibrations asymétriques et symétriques des groupes carboxyles (**Dong et al., 2006**). Les bandes caractéristiques de la gélatine à 1646, 1550 et 1237 cm^{-1} sont assignées à l'amide-I (vibrations d'élongation C=O et C-N), à l'amide II et à l'amide III (vibration de déformation principalement de N-H et vibration d'élongation de C-N), respectivement (**Carbonaro et al., 2010**).

Des groupes fonctionnels comprenant NH_2 , en particulier issus de la lysine,

peuvent être perdus, tandis que la quantité de ceux associés aux produits de Maillard tels que les composés d'Amadori (C=O), la base de Schiff (C=N) et les pyrazines (C-N) augmentent pendant la réaction de Maillard (**Farhat *et al.*, 1998**). La région de 1800 à 800 cm^{-1} est souvent utile pour l'analyse de la matière protéique, car les liaisons actives qui forment le groupe amide (C-O, N-H et C-N) et liées aux MRP absorbent l'énergie dans cette région de longueur d'onde (**Liu *et al.*, 2014**).

La plage entre 900 à 750 cm^{-1} dans le spectre de l'alginate (**Figure III.8**) correspond à la configuration anomérique des extrémités de l'acide mannuronique et guluronique (**Figure III.7**), et l'intensité dans cette gamme de nombres d'onde pour le mélange alginate-gélatine est inférieure à celle d'alginate. Ce qui indique que la région anomérique d'alginate est modifiée suite à l'ajout de la gélatine (**Nooshkam *et al.*, 2016**).

De plus, la nouvelle bande à 1517 cm^{-1} observée nous informe que la base de Schiff (double liaison C=N, produits intermédiaires d'Amadori) s'est formée entre les groupes carbonyle de NaAlg et les amino-groupes de la gélatine (**Kareb *et al.*, 2017**). L'intensité de ce groupe augmente avec le pH à T = 80°C et 90°C.

Après la formation des bases de Schiff, une grande variété de réactions subséquentes est impliquée dans la réticulation du matériau. Il a été reporté par **Kareb *et al.*, (2017)** que la base de Schiff résultante est labile et peut subir un réarrangement qui produit un aminokétose (**Figure III.9**) stable qui s'appelle le produit d'Amadori (**Fayle *et al.*, 2002**).

Les produits d'Amadori (C=O) donnent lieu à des pics à 1660 et 1700 cm^{-1} (**Kareb *et al.*, 2017**). Dans notre cas, de nouveaux pics à 1743 cm^{-1} et 1683 cm^{-1} (**Figure III.8**) correspondant au groupe carbonyle (C=O) du produit d'Amadori sont observés dans les spectres des AG (70, 80 et 90).

On voit également que l'intensité des bandes à 1600-1400 cm^{-1} diminue lorsque NaAlg est ajouté. Ces changements des bandes d'amide I et d'amide II reflètent que les groupes carbonyles dans l'alginate et les amino-groupes dans la gélatine sont consommés pendant le processus de chauffage et dans les milieux alcalins.

Ces résultats confirment que l'alginate est réticulé avec de la gélatine suite à la réaction de Maillard et sont en accord avec le travail établi par **Liu *et al.*, (2014)**.

En ce qui concerne la formation d'ène-diol, les akènes (produits énolique) absorbent dans la région entre 1620 et 1700 cm^{-1} (Yaylayan *et al.*, 2005).

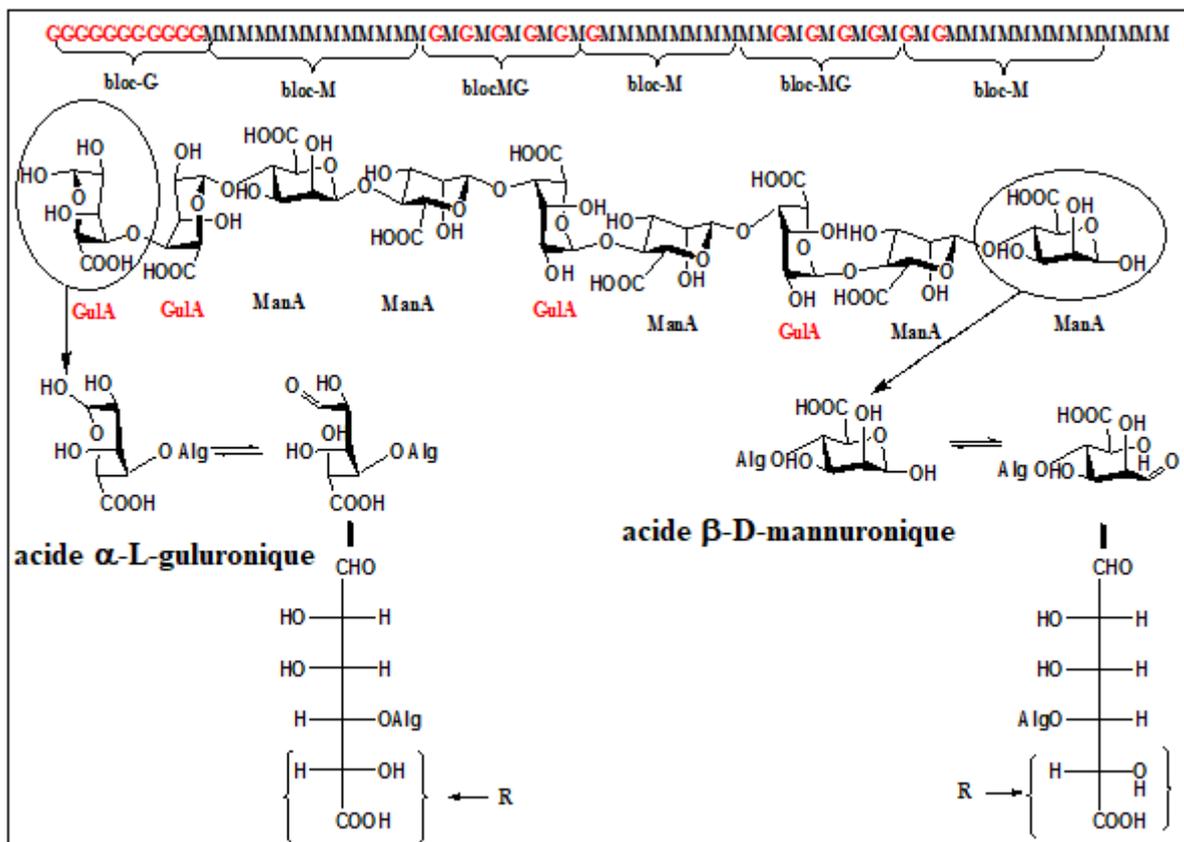


Figure III.7 : Structure moléculaire de l'alginate et équilibre entre les formes cycliques et les chaînes ouvertes dans l'acide α -L-guluronique et l'acide β -D-mannuronique.

La formation d'une nouvelle bande dans notre cas à 1620 cm^{-1} indique que les produits intermédiaires de la réaction de Maillard (enediol) sont formés. Cette bande diminue jusqu'à sa disparition à $\text{pH} = 11$ pour AG- (70, 80 et 90°C). À $T = 90^\circ \text{C}$, des pics dans la gamme de $1460\text{-}1397 \text{ cm}^{-1}$ diminuent, soulignant un certain degré d'interaction entre la gélatine et NaAlg (García-Bermejo *et al.*, 2012). Une diminution à 1025 cm^{-1} est observée en raison de la glycation de NaAlg et de sa participation à la formation de composants de Maillard lorsque la température et le pH de la réaction augmentent.

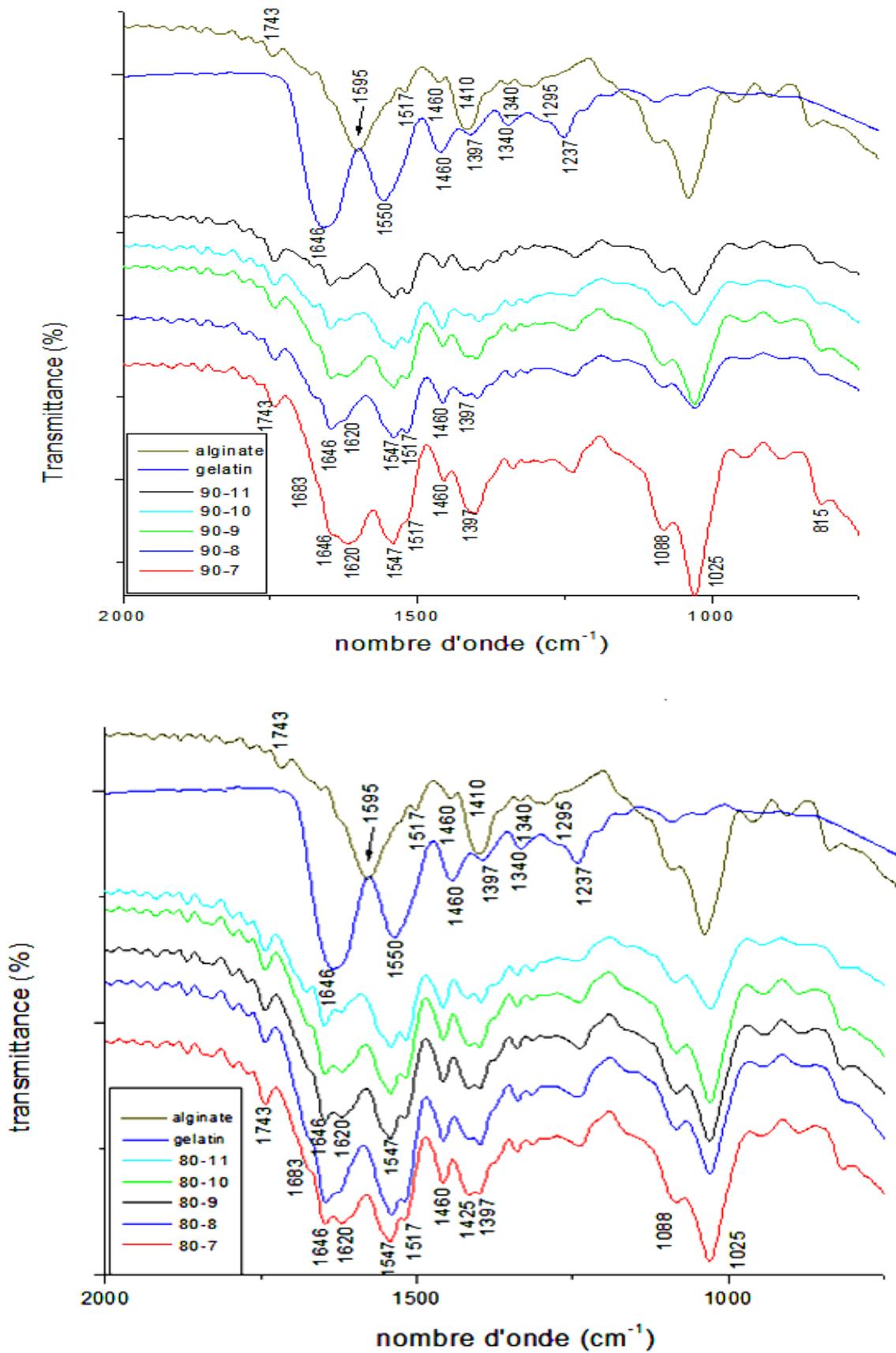


Figure III.8 : Spectres IR-TF de l'alginate, de la gélatine et des différents AG préparés (voir la suite de la figure dans la page suivante).

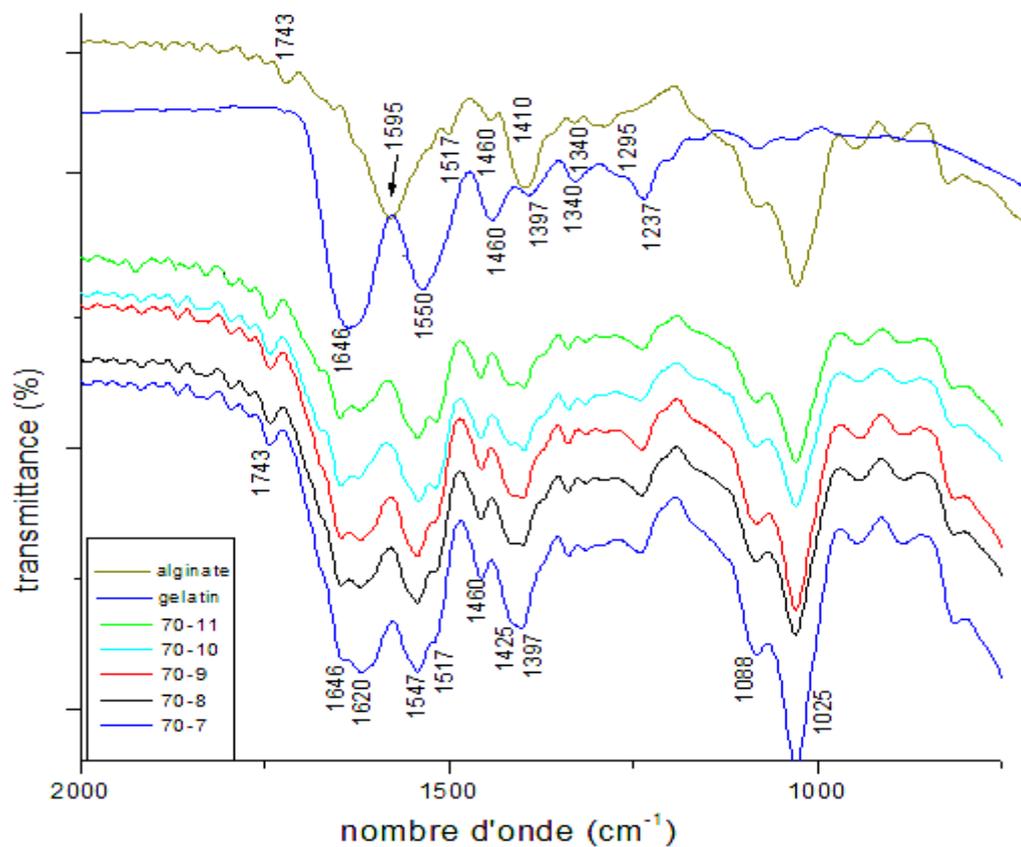


Figure III.8 : Spectres IR-TF de l’alginate, de la gélatine et des différents AG préparés.

Une représentation schématique simplifiée des étapes impliqués dans la formation des principaux conjugués obtenus à partir des spectres alginate/gélatine au cours de la réaction de Maillard est donnée dans la **Figure III.9**.

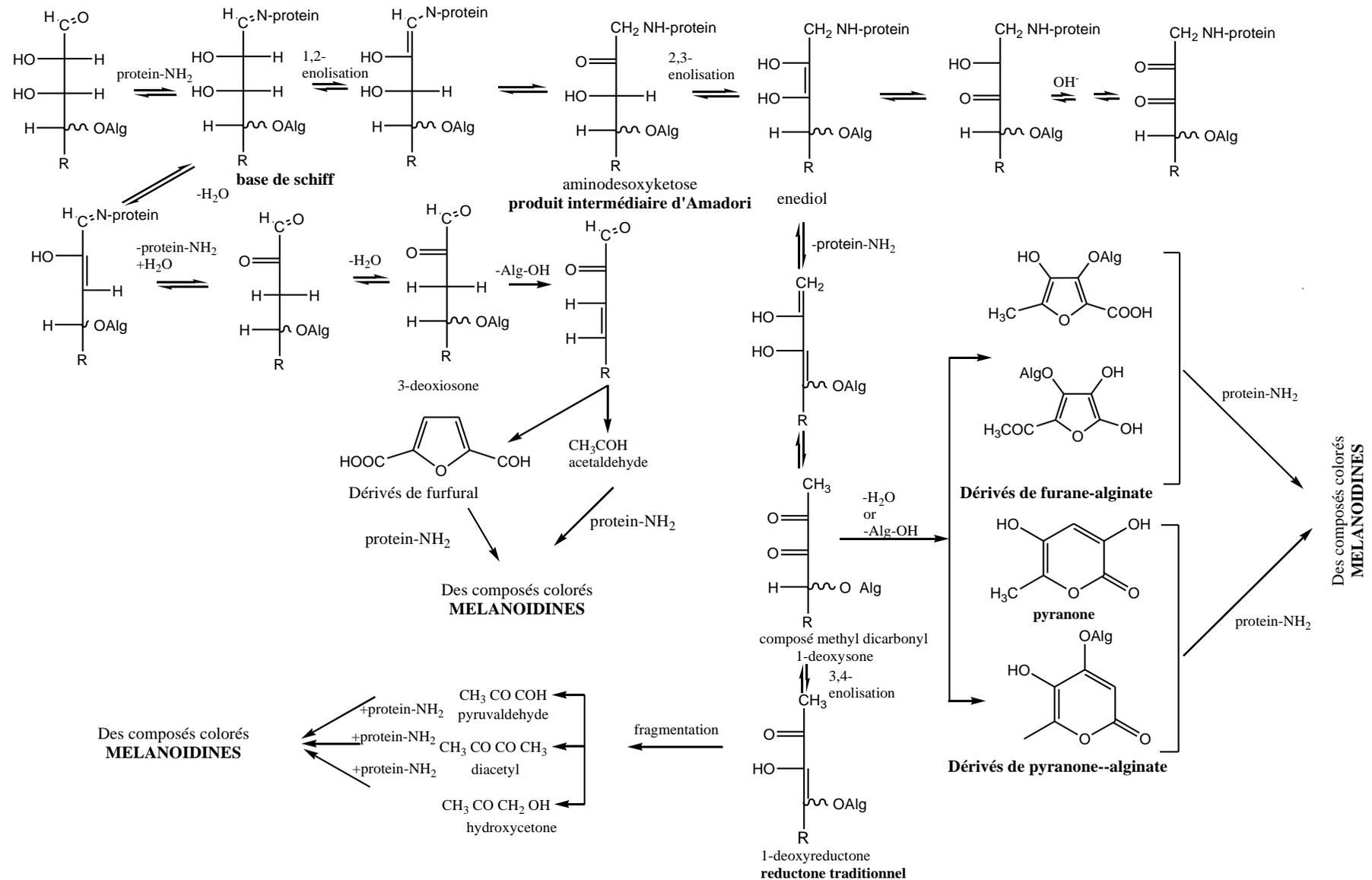


Figure III.9 : Représentation schématique des étapes impliquées dans la formation des conjugués principaux obtenus à partir du système alginate-gélatine au cours de la réaction de Maillard.

VII. Diffraction des rayons X

Comme il a été décrit dans la littérature (**Tanioka *et al.*, 1976**), la gélatine (**Figure III.10 a**) présente deux pics : le premier, fin et faible, à $2\theta = 7,75^\circ$, et le second, large et plus intense, à $2\theta = 20,08^\circ$. Ces pics sont attribués à la structure cristalline de la macromolécule.

Pour ce qui est de l'alginate, son diffractogramme est constitué de trois pics ($14,3^\circ$; $21,3^\circ$ et $37,1^\circ$) qui sont assignés à la structure cristalline de ce polysaccharide (**Kuila *et al.*, 2014**).

Après la réaction de l'alginate avec la gélatine, les pics de diffraction initialement décrits disparaissent. Cela s'explique par la destruction de la disposition ordonnée et compacte de la gélatine ainsi que celle de l'alginate (**Luo *et al.*, 2013** ; **Dong *et al.*, 2006**).

De nouveaux pics de faibles intensités surgissent dans les diffractogrammes des RX de AG70-11, de AG80-11 et de AG90-11 (**Figure III.10 c-e**) et ils possèdent respectivement des angles $2\theta^\circ = 15,80^\circ$, $31,06^\circ$ et $41,8^\circ$ pour AG70-11; $2\theta^\circ = 13,34^\circ$, $16,46^\circ$, $31,09^\circ$ et $41,88^\circ$ pour AG80-11 et $2\theta^\circ = 14,65^\circ$, $31,06^\circ$ et $41,15^\circ$ pour AG90-11.

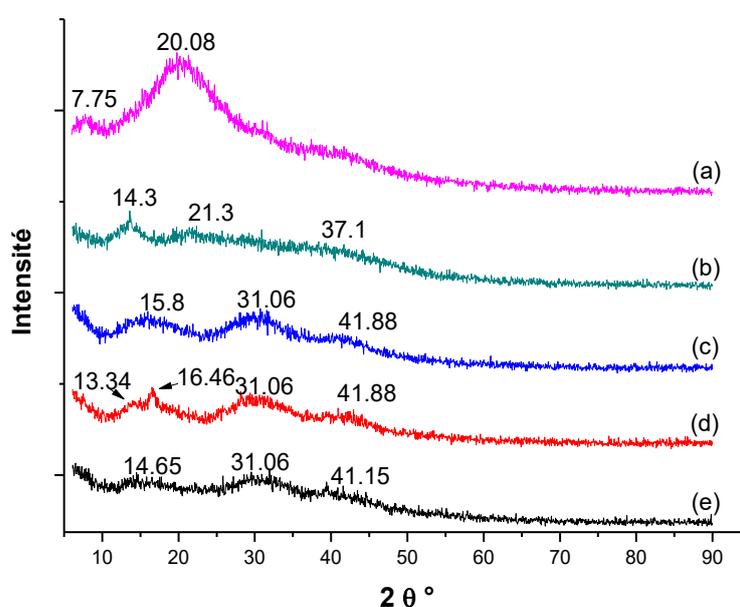


Figure III.10: Diffractogrammes des rayons X de : (a) la gélatine, (b) l'alginate, (c) AG70-11, (d) AG80-11 et (e) AG90-11.

VIII. Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les thermogrammes TG d'alginate-gélatine à différentes température (70°C, 80°C et 90°C) et aux pHs=7 et 11 sont donnés dans la **Figure III.11**. Nous avons la première étape de la perte en poids entre 40-85°C. Selon **Sadeghi et al., (2011)**, cette perte de poids est associée à l'évaporation de l'eau absorbée par les matériaux.

Une deuxième décomposition est observée entre 220 à 280°C. Ceci est attribué à la décomposition de la structure polysaccharidique de l'alginate (**Srinivasan et al., 2012**). De plus, nous évoquons qu'une décomposition assez remarquable entre 140°C et 190°C est observée dans le cas d'AG70-7 et AG90-7.

Une troisième décomposition débute à partir de 265°C jusqu'à 469°C. Nous comptons ici plus de 60% de perte en poids. Cette étape est attribuée, comme il a été décrit par **Sadeghi et al., (2011)**, à la dégradation de la gélatine.

Pour le produit de la réticulation à pH=11, la vitesse de décomposition des films à ce pH est inférieure à celle des films préparés à pH=7.

Par contre, les poids résiduels sont relativement élevés. Cette stabilité thermique est généralement attribuée à la réticulation des matériaux (**Chen et al., 2012**).

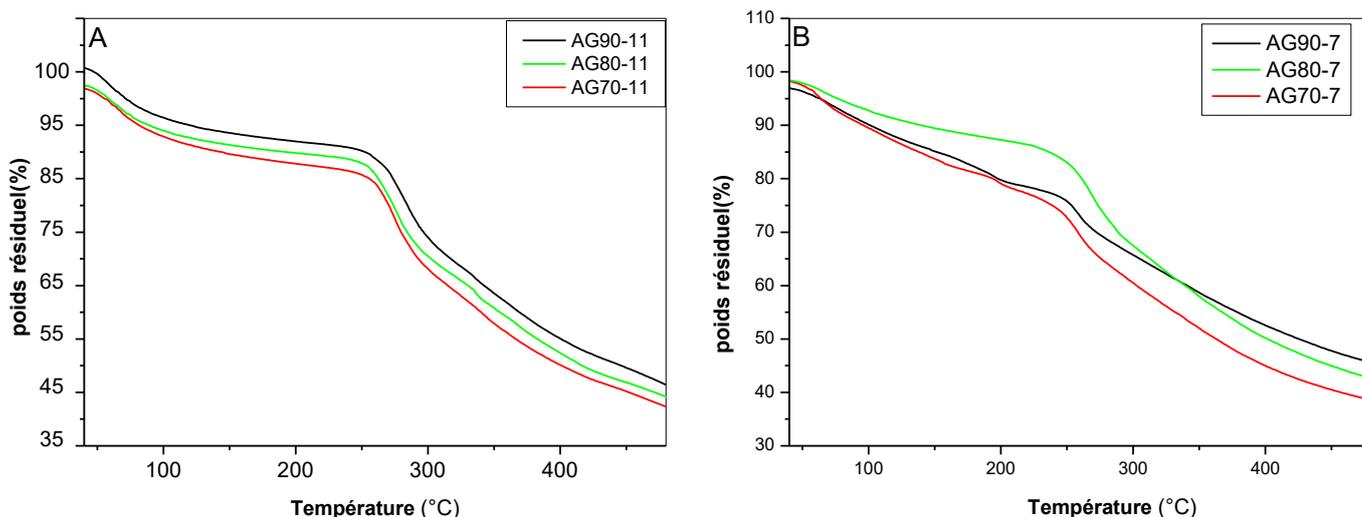


Figure III.11. Thermogrammes TG des films obtenus à T= 70°C, 80°C et 90°C et aux pHs=11 (A), pH=7 (B).

IX. Microscopie à force atomique (AFM)

La **figure III.12** montre les différentes images des différents films étudiés. L'image de l'alginate révèle une surface différente de celle de la gélatine. Des agrégats de petites tailles apparaissent sur l'alginate (0,5 μ m) alors que, dans le cas de la gélatine, ils sont beaucoup plus importants en volume (de l'ordre de 1 μ m).

Pour les alginates additionnés à la gélatine à travers la réaction de Maillard, nous remarquons que l'effet de la température utilisée lors de notre étude influe fortement la taille des agrégats. Ces derniers diminuent quand la température augmente. Ils atteignent 375 nm pour AG70-11 et 124,60 nm pour AG90-11.

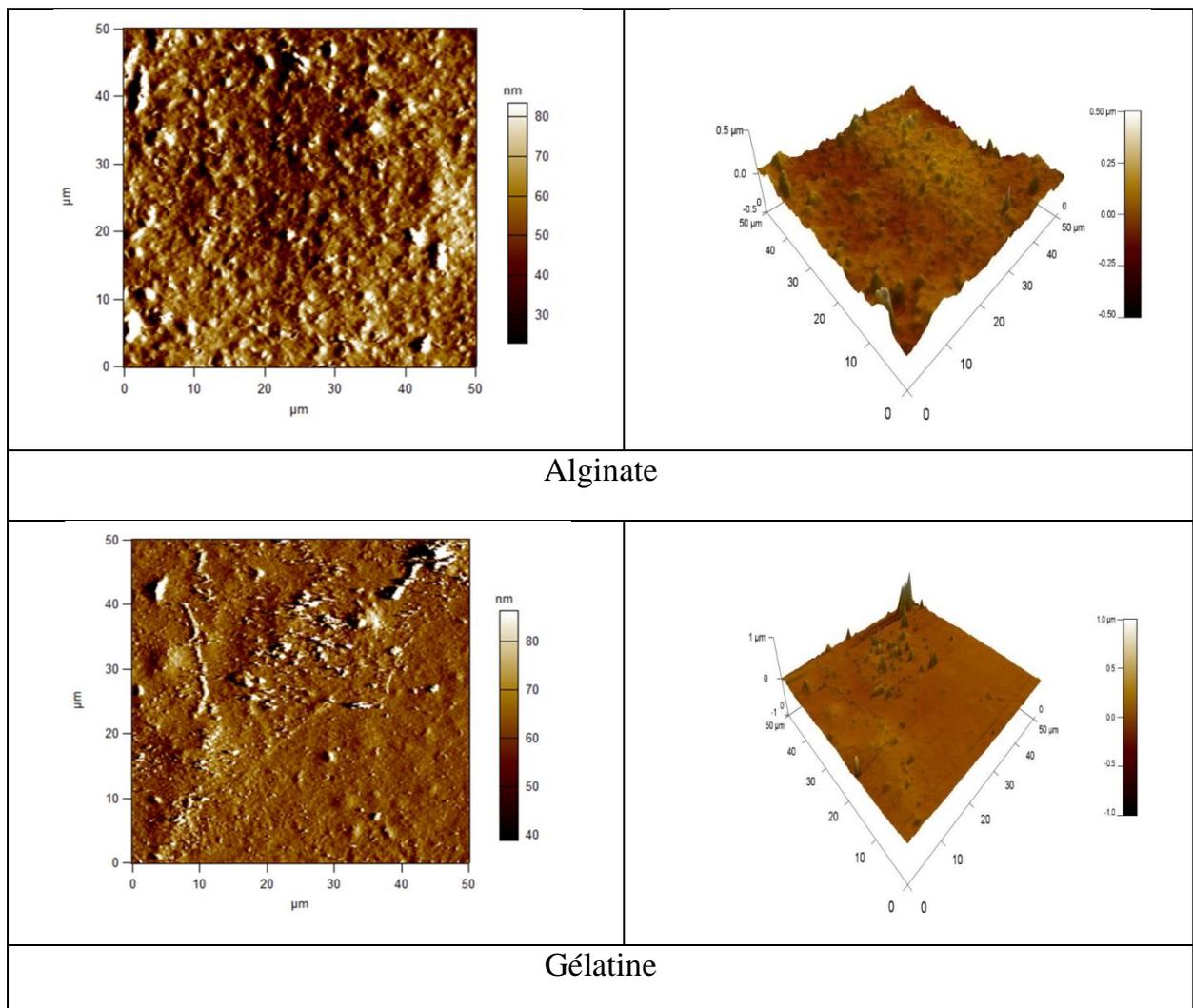


Figure III.12 : AFM des différents films étudiés (voir la suite de la figure dans la page suivante).

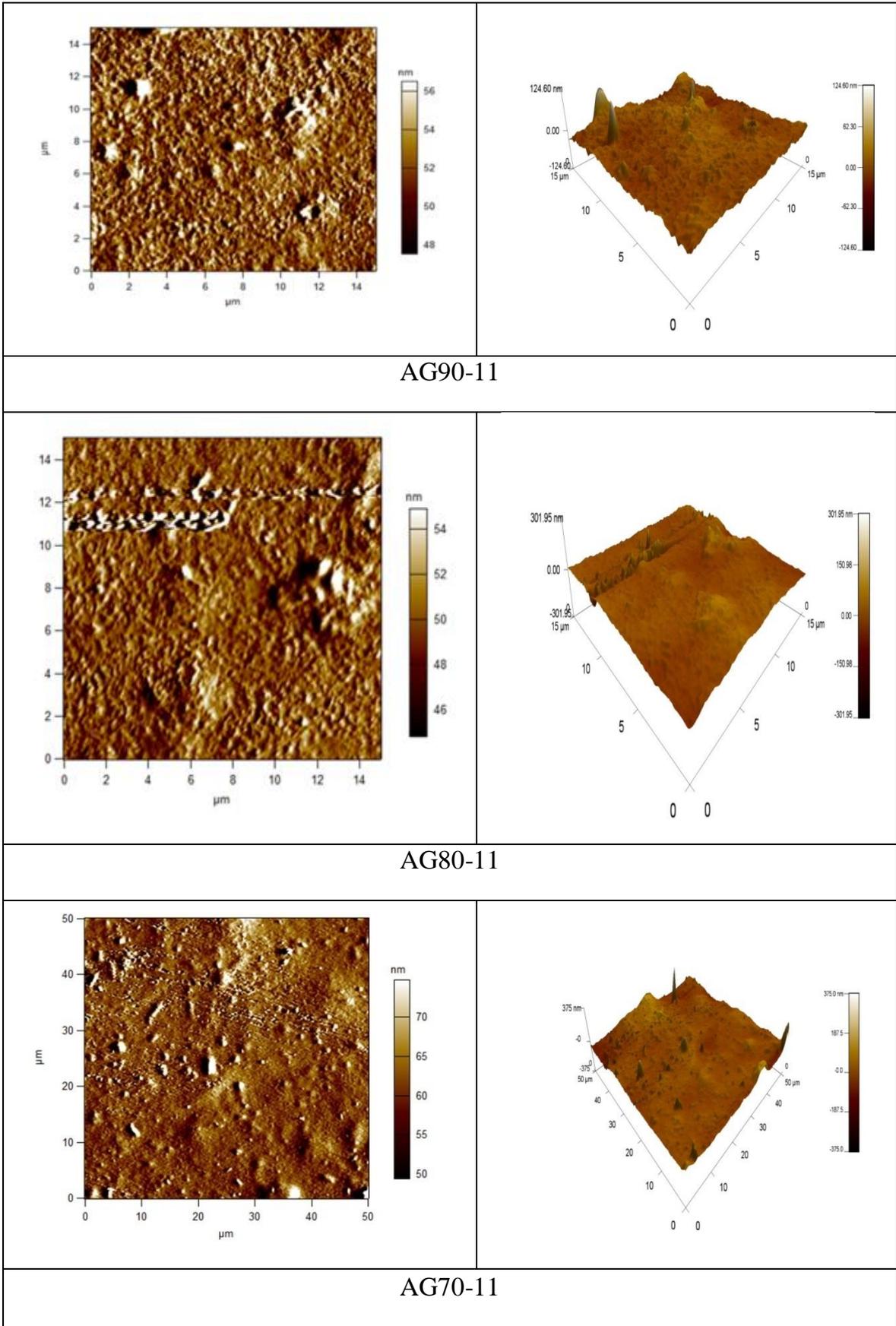


Figure III.12 : AFM des différents films étudiés.

Ces amas peuvent être dus à des zones cristallines qui se sont formées suite au processus de réticulation. Ce qui est en accord avec les résultats obtenus par DRX où la cristallinité des films diminue lorsque la température augmente.

X. Activité antioxydante

X.1. Activité antioxydante par la méthode du DPPH

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage des différents radicaux. De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH• est recommandé pour des composés contenant les groupes SH-, NH- et OH-. Ce test est largement utilisé car il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles (Popovici *et al.*, 2009).

En présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène, le radical libre DPPH• initialement violet se réduit en un composé non radicalaire DPPH-H coloré en jaune (Figure III.14) (Redouan *et al.*, 2011).

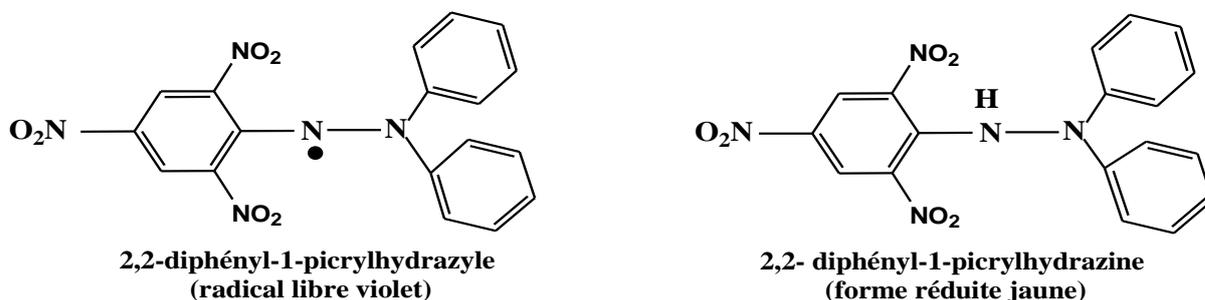


Figure III.13 : Structures chimiques du radical libre, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle, et de sa forme réduite.

Selon Liu *et al.*, (2013), les produits de la réaction de Maillard (MRPs) comprenant des intermédiaires ou des polymères bruns peuvent agir comme donneurs

d'hydrogène et manifestent par conséquent une activité antioxydante. De même, plusieurs auteurs ont prouvé que les produits contenant des MRPs (formés ou ajoutés) possèdent une activité antioxydante (**Vhangani *et al.*, 2013 ; Chawla *et al.*, 2007 & Liu *et al.*, 2013**).

La concentration inhibitrice demi-maximale (IC_{50}) est déterminée à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition (I%) en fonction de la concentration massique (mg/mL) (**Figures VI.1, Annexes**).

Les concentrations (IC_{50}) de l'alginate en l'absence ou en présence de la gélatine réticulée à 70, 80 et 90°C sont donnés dans la **figure III.14**.

Lertittikul *et al.*, (2007) ont trouvé, pour le système protéine plasma-glucose, que les pHs les plus élevés entraînent une activité antioxydante considérable, comparée à celle aux pHs faibles utilisés.

Les MRPs préparés à pH=10, selon **Lertittikul *et al.*, (2007)**, présentent une activité antioxydante supérieure à celle obtenue à pH=7. Pour maximiser l'effet antioxydant des MRPs, un pH alcalin semble une bonne condition pour rendre les MRPs avec une bonne activité antioxydante.

À partir de la **figure III.14**, tous nos matériaux préparés ont une activité de piégeage remarquable mais désormais elle reste inférieure à celle du BHT.

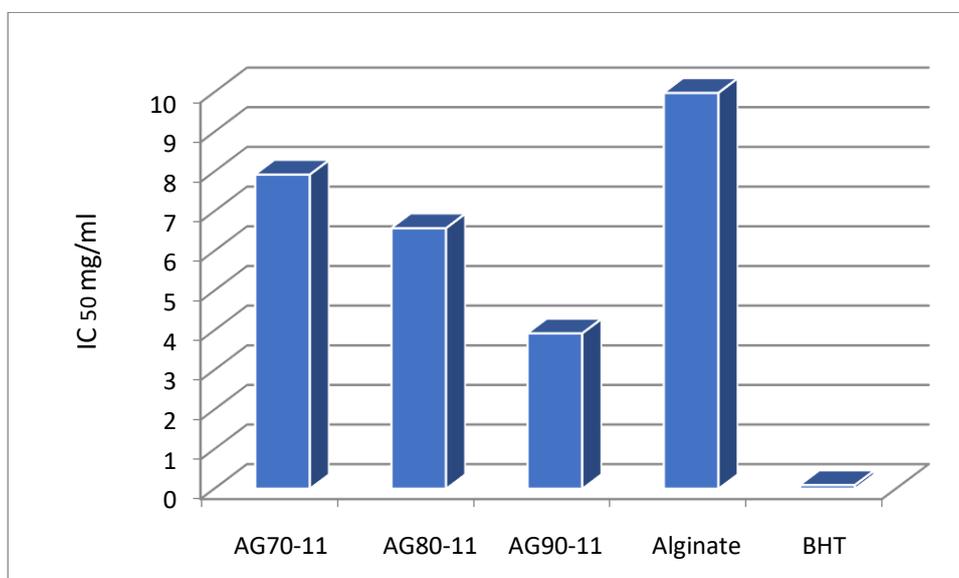


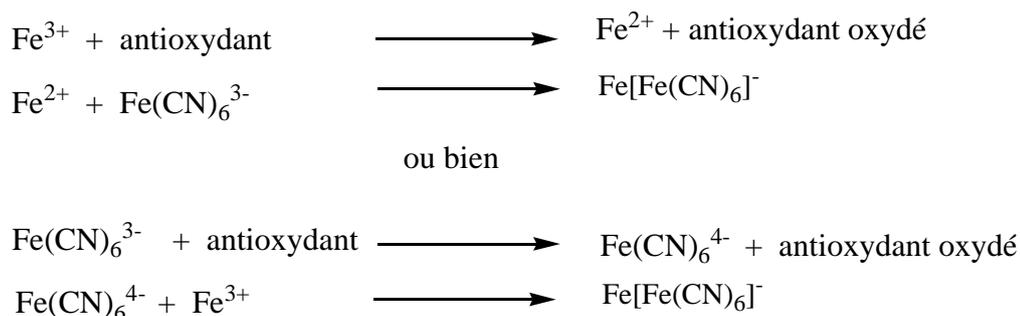
Figure III.14 : IC_{50} de l'alginate, d'AG70-11, d'AG80-11, d'AG90-11 et du BHT.

Quant à l'alginate, son IC₅₀ est la plus élevée (de l'ordre de 10 mg/mL) par rapport à celles de nos formulations étudiées. Ces résultats nous révèlent aussi que l'effet scavenger évolue quand la température de la réaction augmente. Les IC₅₀ dans le cas d'AG70-11, d'AG80-11 et d'AG90-11 sont respectivement de 7,8 mg/mL, 6,2 mg/mL et 3,4 mg/mL.

X.2. Pouvoir réducteur

Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des échantillons à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺). En effet, le Fe³⁺ participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton.

La présence de réducteurs dans les échantillons entraîne la réduction du complexe Fe³⁺/ferricyanure à la forme ferreux. Par conséquent, des Fe²⁺ peuvent être évalués en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à λ=700nm (**Phisut et al., 2013**).



Pour les MRPs issus de nos échantillons, le pouvoir réducteur augmente avec la concentration et la température comme on peut le voir sur la **figure III.16**. Selon **Phisut et al., (2013)**, le pouvoir réducteur des MRPs augmente avec l'augmentation de la température. Cela peut être causé par la formation des produits d'Amadori qui présentent un pouvoir réducteur élevé en raison de leur capacité à donner des atomes d'hydrogène (**Liu et al., 2013 ; Huang et al., 2012 & Amarowicz 2009**).

Le pouvoir réducteur des échantillons dépend aussi de la concentration. À une concentration de 0,3-2,3 mg/mL pour l'acide ascorbique, 2,3-12,3 mg/mL pour AG90-

11, 2,3-21,3 mg/mL pour AG80-11, 4,6-26,3 mg/mL pour AG80-11, les pouvoirs réducteurs respectifs sont 0,1-1, 0,15-1,05, 0,12-0,95, 0,11-0,68. Mais, le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique réside significativement plus élevé que ceux de AG90-11, AG80-11, AG70-11.

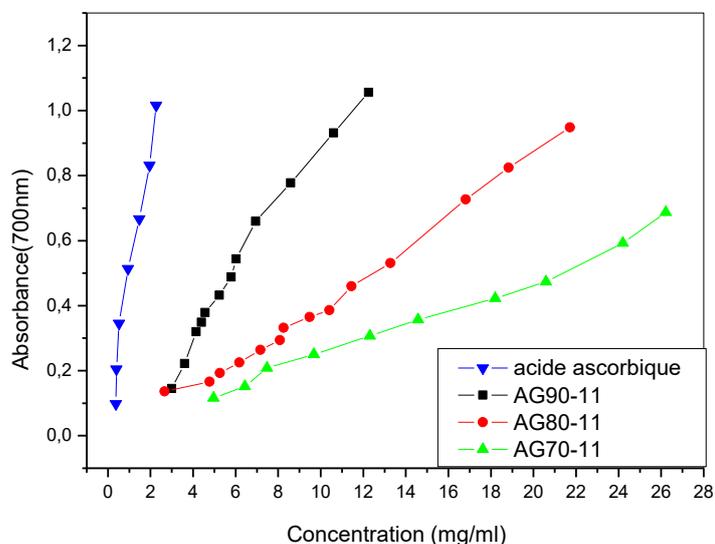


Figure III.15 : Absorbances des composés testés à $\lambda_{\max} = 700$ nm en fonction de la concentration (mg/mL).

XI. Activité anti inflammatoire

L'alginate ainsi que l'acide β -D-mannuronique montrent une efficacité en tant qu'anti-inflammatoires lorsqu'ils sont testés dans diverses maladies inflammatoires (Mirshafiey *et al.*, 2009).

Kitts *et al.*, (2012) ont découvert que les MRPs dérivés du système glucose-lysine ont des activités anti-inflammatoires et peuvent potentiellement protéger contre l'inflammation intestinale ou d'autres maladies inflammatoires.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de nos échantillons à différentes concentrations sont donnés dans le **tableau III.1**. Ce dernier révèle que tous les composés testés présentent une inhibition significative de la dénaturation de l'albumine de l'œuf en fonction du degré de chauffage et que AG90-11 présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé par rapport à ceux de AG70-11 et AG80-11.

Il est également noté que, comme mentionné dans le **tableau III.2**, le

pourcentage d'inhibition de la protéine observée pour l'ibuprofène et le diclofénac sodique (à 100 et 200 µg / mL) est beaucoup plus élevé que les valeurs obtenues pour AG70-11, AG80-11 et AG90-11.

Tableau III.1: Effets anti-inflammatoires des matériaux étudiés *In-vitro* par la dénaturation de l'albumine de l'œuf.

AG70-11		AG80-11		AG90-11	
Concentration (mg/mL)	Inhibition (%)	Concentration (mg/mL)	Inhibition (%)	Concentration (mg/mL)	Inhibition (%)
25	19.05	20	18.67	7.5	17.8
30	19.47	25	19.59	10	55.6
35	19.31	30	20.11	15	65.7
40	20.27	35	21.49		

Tableau III.2: Effets anti-inflammatoires de l'Ibuprofène et du Diclofénac de sodium *in vitro* par la dénaturation de l'albumine de l'œuf.

Ibuprofen		Diclofenac sodium	
Concentration (µg/mL)	Inhibition (%)	Concentration (µg/mL)	Inhibition (%)
100	98.02	100	63.31
200	125.25	200	76.51

XII. Activité antibactérienne

Au départ, nous devons mentionner que la gélatine est un nutriment et qu'elle est complètement dépourvue d'activité antibactérienne (**Bindu et al., 2010**).

En revanche, concernant l'alginate, **Kamoun et al., (2013)** ont trouvé que les films à base d'alginate peuvent être utilisés pour nettoyer de grande surfaces de lésions sécrétantes car les pansements d'alginate sont hautement absorbants. Ce qui limite les sécrétions des plaies et réduit la contamination bactérienne (**Laurienzo, 2010**).

De même, les MRPs ayant différentes masses moléculaires issus des fèves de cacao inhibent la croissance de *E. coli* spp. et *Enterobactercloaceae* (**Summa et al.,**

2008). Hiramoto *et al.*, (2004) ont aussi trouvé une suppression de *Helicobacter pylori in vitro* aussi bien qu'*in vivo* par des mélanoidines formées à partir du système caséine-lactose.

Tableau III.3 : Diamètres d'inhibition des croissances bactériennes (mm).

Bactérie échantillon	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Alginate	10mm	10mm	10mm
AG70-7	12mm	10mm	11mm
AG70-8	12mm	11mm	11mm
AG70-9	12mm	14mm	11mm
AG70-10	13mm	12mm	12mm
AG70-11	14mm	21mm	-
AG80-7	11mm	10mm	10mm
AG80-8	-	13mm	9mm
AG80-9	10mm	-	8mm
AG80-10	18mm	13mm	5mm
AG80-11	-	14mm	6mm
AG90-7	-	-	-
AG90-8	12mm	10mm	7mm
AG90-9	15mm	15mm	2mm
AG90-10	-	19mm	5mm
AG90-11	17mm	20mm	7mm

- : Le diamètre d'inhibition non déterminé.

Dans notre cas, la réticulation de l'alginate par la gélatine selon la réaction de Maillard a montré que nos films entraînent, en général, une inhibition de la croissance bactérienne à gram positifs (*Staphylococcus aureus*) et à gram négatifs (*Escherichia*

coli, *Pseudomonas aeruginosa*). Les diamètres d'inhibition mesurés sont illustrés dans le **tableau III.3**. On note que l'inhibition maximale est observée sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Les diamètres d'inhibition par action de AG70-11 et AG90-11 sont identiques et sont égaux à environ 20 à 21 mm.

Par contre, cette inhibition est relativement faible sur *S. aureus* et moyenne à élevée sur *E. coli*.

CONCLUSION.

Les travaux que nous avons abordés ont pour but d'étudier deux types de modifications chimiques de l'alginate de sodium. L'oxydation par l'hypochlorite de sodium et la réticulation avec la gélatine à travers la réaction de Maillard.

L'oxydation de l'alginate a été suivie par trois différentes méthodes de dosage : La première permet de quantifier les groupements carbonyles, la seconde les carboxyles et la troisième les aldéhydes. Les résultats obtenus montrent que les teneurs en carbonyles (%) et en carboxyles (%) augmentent avec la concentration de l'agent oxydant. Par contre, aux concentrations en chlore actif allant de 0,25% à 1,5%, le taux en aldéhyde connaît une évolution puis diminue à la concentration en chlore actif de 3%. Ce qui traduit une transformation oxydative des aldéhydes en carboxyles. Cependant, les titrations par pHmétrie et par conductimétrie montrent que les quantités en -COO^- augmentent avec la concentration en Cl_{actif} et ils sont estimés respectivement dans le cas de l'Alg, OAlg1 et OAlg4 à 1,49 meq/g, 1,60 meq/g et 1,70 meq/g.

L'analyse par spectroscopie infrarouge dévoile, par ailleurs, sans ambiguïté que l'oxydation a bien eu lieu. Il y a des intensifications remarquables des pics à 1620cm^{-1} , 1414cm^{-1} et 953cm^{-1} qui caractérisent les groupements carboxyles.

La radiocristallographie par diffraction des rayons X élucide, en revanche, que l'oxydation de l'alginate de sodium entraîne une perte, d'une manière progressive, de la cristallinité qui se manifeste soit par une diminution de certains pics, soit par leur disparition totale. Cela se confirme par la microscopie à force atomique. Cette dernière exhibe que l'alginate oxydé présente une surface homogène par rapport à l'alginate.

La spectroscopie UV montre bien l'augmentation des intensités du pic des alginates oxydés à $\lambda=272$ nm en fonction de la concentration de l'hypochlorite de sodium par rapport à celui de l'alginate natif. Ce résultat s'explique surtout par la formation des nouveaux groupements carbonyles au cours de la réaction d'oxydation.

Quand à la réaction de Maillard, l'étude de l'intensité de la formation de la couleur brune dévoile que cette dernière progresse fortement avec le temps de chauffage. De même, le dosage des protéines par le TNBS nous informe que le taux de la réticulation de la gélatine évolue avec le pH.

Le dosage pHmétrique indique, toutefois, une réaction quasi-complète des amino-groupes avec les groupements carbonyles. Ce qui est en accord avec les résultats du dosage des protéines par la méthode du BCA. Il s'avère dans ce cas que la quantité des protéines libérées diminue lorsque le pH du milieu réactionnel augmente.

La spectroscopie IRTF identifie, par conséquent, la formation de nouveaux composés. Des pics caractéristiques des produits d'Amadori à 1743cm^{-1} et 1683cm^{-1} authentifient la formation des MRPs.

L'analyse par diffraction des RX montre que la disparition des pics de diffraction des matériaux de départ, de l'alginate et de la gélatine, et l'apparition de nouveaux pics de faible intensité. La cristallinité des nouveaux matériaux se trouve réduite par rapport aux matrices de départ dont la topographie observée par AFM devient avec la réaction de Maillard relativement plane.

En outre, une stabilité thermique est observée par ATG. Elle est probablement due à la réticulation du matériau.

Pour ce qui est des études biologiques réalisées, elles sont encourageantes pour persévérer dans nos deux axes de recherche. Nos différents matériaux se montrent pourvus d'action anti-inflammatoire remarquable comparée à celle de l'alginate qui est déjà connu pour ses vertus dans le domaine du génie tissulaire. Les tests *in vitro* affirment également qu'ils sont tous hémocompatibles et qu'ils sont dotés d'un pouvoir antioxydant. Enfin, Ils manifestent tous, mais d'une manière aléatoire, une activité antibactérienne à l'égard des trois souches bactériennes étudiées, le *S. aureus*, l'*E. coli* et le *P. aeruginosa*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

A

- Adrian J. (1999). Louis Camille Maillard : De La Médecine à L'alimentation. *Paris, Tec & Doc*, Editions médicales internationales. 154.
- Ahmad M., Benjakul S. (2011). Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 381–388.
- Ajandouz E, Puigserver A. (1999).« Nonenzymatic Browning Reaction Of Essential Amino Acids: Effect Of pH On Caramelization And Maillard Reaction Kinetics », *J. Agric. Food Chem.* 47, 1786- 1793.
- Alais C, Linden G. (1987). « Biochimie alimentaire », *Paris, Masson Editeur*, 224 .
- Amarowicz R. (2009). Antioxidant activity of maillard reaction products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111, 109–111.
- Ames J. (1988) .«The Maillard Browning Reaction : An Update», *Chem. Ind*, 5, 558–561.
- Ames J. (1998). «Applications Of The Maillard Reaction In The Food Industry», *Food Chemistry*, 62(4), 438.
- Andresen I, Painter T, Smidsrbd O. (1977).«Note Concerning The Effect Of Periodate Oxidation Upon The Intrinsic Viscosity Of Alginate», *Carbohydrate Research*,, 59, 565–566.
- Anese M, Lanciotti R, Sinigaglia M, Massini R. (1998).« Response Surface Methodology Applied To The Study Of Some Factors Affecting The Maillard Reaction », *Adv. Food Sci* 20, 190-197.
- Apriyantono A, Ames J. (1990).« Volatile Compounds Produced On Heating Lysine With Xylose », *In Flavour Science and Technology*. Y. Bessiere, A.F. Thomas (Eds). Chichester, John Wiley, 117- 120.

B

- Bailey R, Ames J, Mann J. (2000). « Identification Of New Heterocyclic Nitrogen Compounds From Glucose-Lysine And Xylose-Lysine Maillard Model Systems », *J. Agric. Food Chem.* 48: 6240-6246 .
- Barbenti D, Mastrocola D, Lericci C. (1990). Early Indicators Of Chemical Changes In Food Due To Enzymic Or Non Enzymic Browning Reactions. Part II: Colour Changes In Heat Treated Model Systems. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 23, 494-498.
- Bazid S. (2013). Etudes spectrale et microscopique du système gelatine/carboxyméthylcellulose sodique en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et du glucose dans le domaine alimentaire. *Thèse de Doctorat En génie des procédés*

- Benzeggouta N. (2005). Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments. *Mémoire de Magister*. Université Mentouri de Constantine. Algérie.
- Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, (2001). Mechanical and Thermal Properties of Gelatine Films at Different Degrees of Glutaraldéhyde Crosslinking. *Biomaterials*, 22, 763–768.
- Bindu H, Vidyavathi M, Kavitha K, Sastry T, Suresh K. (2010). Preparation and Evaluation of Chitosan-Gelatin Composite Films for Wound Healing Activity. *Trends Biomater. Artif. Organs*, 24(3), 123–130.
- Boanini E, Rubini S, Panzavolta, Bigi A. (2010). Chemico-physical characterization of gelatin films modified with oxidized alginate. *Acta Biomaterialia*, 6(2), 383–388.
- Boontheekul T, Kong H, Mooney D. (2005). Controlling alginate gels degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution. *Biomaterials*, 26, 2455–2465.
- Boris P, Shimona G, Robert M. (2004). Synthesis and Characterization of a Biotin-Alginate Conjugate and Its Application in a Biosensor Construction. *Biomacromolecules*, 4(2), 389–396.
- Bouras k. (2012). Etude et conception de nouveaux pansements de nature hydrocolloïde. *Thèse de Doctorat En génie des procédés pharmaceutiques*, université Ferhat Abbas – Setif-1.
- Bruneton J. (1999). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales" 3^{ème} édition: Tec et Doc. Paris.
- Bubnis A. (1996). Chemical and Swelling Evaluations of Amino Group Crosslinking in Gelatin and Modified Gelatine Matrices. *Pharm Res*, 13(12), 1821-1827.
- Bubnis A, Ofner C. (1996). Chemical and Swelling Evaluations of Amino Group Crosslinking in Gelatin Matrices'. *J. Pharm Res*, 13, 1821–1827.
- Bubnis A, Ofner C. (1992). The Determination of ϵ -Amino Groups in Soluble and Poorly Soluble Proteinaceous Materials by a Spectrophotometric Method Using Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Analytical Biochemistry*, 133(207), 129–133.
- Buera P, Chirife J, Resnik S, Wetzeler G. (1987). Nonenzymatic Browning In Liquid Model Systems Of High Water Activity ; Kinetics Of Color Changes Due To Maillard Reaction Between Different Single Sugars And Glycine In Comparison With Caramelization Browning. *Food Chem*. 52, 1063-1067.
- Bu H, Kjoniksen A, Elgsaeter A, Nystrom B. (2006). Interaction of unmodified and hydrophobically modified alginate with sodium dodecyl sulfate in dilute aqueous solution Calorimetric , rheological , and turbidity studies. *Colloids and Surfaces*, 278,

C

- Cämmerer B, Jalyschko W, Kroh L. (2002). Intact Carbohydrate Structures As Part Of The Melanoidin Skeleton. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2083-2087.
- Carabasa-Giribet M., Ibarz-Ribas A. (2000). Kinetics of colour development in aqueous glucose systems at high temperatures. *Journal of Food Engineering*, 44(3), 181–189.
- Carbonaro M., Nucara A. (2010). Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. *Amino Acids*, 38, 679–690.
- Carré M. (1991). Covalent Coupling Of A Short Polyether On Sodium Alginate : Synthesis And Characterization Of The Resulting Amphiphilic Derivative. *Carbohydrate Polymers*, 16, 367–379.
- Carré M, Delestre C, Hubert P, (1991). Covalent Coupling Of A Short Polyether On Sodium Alginate : Synthesis And Characterization Of The Resulting Amphiphilic Derivative. *Carbohydrate Polymers*, 16, 367–379.
- çelebi I. (2006). Color Formation In Wheat Starch Based Glucose Syrups And Use Of Activated Carbons For Sugar Decolorization. *Thèse de Master En Science*, Université technique du Moyen-Orient.
- Chaibi S. (2014). Préparation et caractérisation des films de gélatine modifiée et réticulée à usage pharmaceutique. *Thèse de Doctorat En génie des procédés pharmaceutiques*, université Ferhat Abbas –Setif-1.
- Chattopadhyay M, Gupta S, Sengupta D, Ghosh B. (1997). Expression of arginine decarboxylase in seedlings of indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars as affected by salinity stress. *Plant molecular biology*, 34(3), 477-483.
- Chawla S, Chander R., Sharma A. (2007). Antioxidant formation by γ -irradiation of glucose-amino acid model systems. *Food Chemistry*, 103(4), 1297–1304.
- Chen H, Wang Y, Sánchez-soto M., Schiraldi D. (2012). Low fl ammability , foam-like materials based on ammonium alginate and sodium montmorillonite clay. *Polymer*, 53(25), 5825–5831.
- Cheriot S. (2007). Role Des Produits De La Reaction De Maillard Dans L'inhibition De L'oxydation Enzymatique Des Phenols Et Des Lipides. *Thèse de Doctorat En Sciences de L'aliment*, Institut des Sciences et Industries (Paris).
- Chetouani A. Elkolli M. Bounkhel M. Benachour D. (2014). physicochemical characterization of gelatin-cmc composite edible films from polyion-complex hydrogels. *J. Chil. Chem. Soc.*, 59(1), 2279-2283.
- Chetouani A. (2015). Elaboration et Bioévaluation de nouvelles classes d'hydrogels à base de pectine avant et après son oxydation par le periodate et/ou par le chlore actif et étude de

leurs effets sur les comportements physico-chimiques et biologiques de la gélatine et du chitosane. *Thèse de Doctorat En génie des procédés pharmaceutiques*, université Ferhat Abbas –Setif-1.

Clotet R, Erruz E, Valero J. (1994). Brunissement Non Enzymatique Dans Un Aliment Complexe En Fonction Du Temps, De L'activité De L'eau, Du pH Et De La Température : Corrélations. *IAA 111*, 667-670.

Covis R. (2011). Synthèse de polysaccharides amphiphiles à partir de dextrane appliquée à la stabilisation d'émulsion directe et inverse. Thèse Doctorat. Université de Toulouse. France.

D

Decourcelle N, Sabourin C, Dauer G, Guérard F. (2010). Effect of the Maillard reaction with xylose on the emulsifying properties of a shrimp hydrolysate (*Pandalus borealis*). *Food Research International*, 43(8), 2155–2160.

Donati I, Paoletti S. (2009). *Material Properties of Alginates*. (B. H. A. Rehm, Ed.) (Vol. 13). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Dong Z, Wang Q, Du Y. (2006). Alginate / gelatin blend films and their properties for drug controlled release. *Journal of Membrane Science*, 280, 37–44.

Draget K, Smidsrød O, Skjåk-bræk G. (2005). Alginates from algae. In A. Steinbüchel and S.K Rhee (Ed.), *Polysaccharides and Polyamides in The Food Industry, Properties, Production, and Patents* pp. 1–30.

Dubois D. (2006). 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.

F

Fan L, Sun Y, Xie W, Zheng H, Liu S. (2012). Oxidized pectin cross-linked carboxymethyl chitosan: a new class of hydrogels. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 23(16), 2119-2132.

Farhat I, Orset S, Moreau P, Blanshard J. (1998). FTIR Study of Hydration Phenomena in Protein-Sugar Systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 207(2), 200–208.

Fayle S, Gerrard J. (2002). The Maillard Reaction. *RSC Food Analysis Monographs*.

Friedman M. (1994). Food Browning And Its Prevention An Overview. *J. Agric. Food Chem*, 44(3), 631–653.

Fushini T. (1997). Gels handbook. *Academic Press, New York*, 1, 68.

G

Galant C, Kjøniksen A, Nguyen G, Knudsen K, Nyström B. (2006). Synthesis Of Amidic Alginate Derivatives And Their Application In Microencapsulation Of Λ -Cyhalothrin -

Biomacromolecules (Acs Publications). *J. Phys. Chem*, 110(1), 190–195.

García-Bermejo A, Cardelle-Cobas A, Ruiz-Matute A, Montas F, Olano A, Corzo N. (2012). Effect of drying methods on the reactivity of chitosan towards Maillard reaction. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 27–34.

Gomez C, Rinaudo M, Villar M. (2007). Oxidation Of Sodium Alginate And Characterization Of The Oxidized Derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 67(3), 296–304.

Gómez-Mascaraque L, Méndez J, Fernández-Gutiérrez M., Vázquez B, Román J. (2014). Oxidized dextrans as alternative crosslinking agents for polysaccharides: application to hydrogels of agarose-chitosan. *Journal of Acta Biomaterialia*, 10(2), 798–811.

Grant G, Morris E, Rees D, Smith P, Thom D. (1973). Biological Interactions Between Polysaccharides And Divalent Cations: The Egg-Box Model. *Febs Letters*, 32(1), 195–198.

H

Haug A, Larsen B, Smidsrød O. (1967). Alkaline Degradation of Alginate. *Acta Chemica Scandinavica*, 21(10), 2859–2870.

Haug A, Smidsrod O. (1965). The Effect Of Divalent Metal On The Properties Of Alginate Solutions, Acta Chemica Scandinavica 19. *Acta Chemica Scandinavica*, 19, 341–351.

Hiramoto S, Itoh K, Shizuuchi S, Kawachi Y, Morishita Y, Nagase M., Kimura N. (2004). Melanoidin, a food protein-derived advanced Maillard reaction product, suppresses *Helicobacter pylori* in vitro and in vivo. *Helicobacter*, 9(5), 429–435.

Hofmann T. (1998). 4-Alkylidene-2-Imino-5-[4-Alkylidene-5-Oxo-1,3-Imidazol-2-Inyl] aza Methylidene- 1,3-Imidazolidine-A Novel Colored Substructure In Melanoidins Formed By Maillard Reactions Of Bound Arginine With Glyoxal And Furan-2-Carboxaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3896-3901.

Hoffmann B, Seitz D, Mencke A, Kokott A, Ziegler G. (2009). Glutaraldehyde and oxidised dextran as crosslinker reagents for chitosan-based scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 20(7), 1495–503.

Huang X, Tu Z, Xiao H, Wang H, Zhang L, Hu Y, Niu P. (2012). Characteristics and antioxidant activities of ovalbumin glycated with different saccharides under heat moisture treatment. *Food Research International*, 48(2), 866–872.

Hyun-Ah K, Gyu-Jong J, Moo-Yeal L, Ji-Won Y. (2002). Effectiveness test of alginate-derived polymeric surfactants. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77(2), 205–210.

I

Inger-Lill A, Terence P, Olav S. (1977). Note Concerning the effect of periodate oxidation upon the intrinsic viscosity of alginate. *Carbohydrate Research*, 59, 565–566.

J

J Govan, (1981). Short Communication Isolation Of Alginate-Producing Mutants Of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas Putida* And *Pseudomonas Mendocina*, 4(1977), 217–220.

K

Kamoun E, Kenawy E, Tamer T, El-Meligy M, Mohy Eldin M. (2013). Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: Characterization and bio-evaluation. *Arabian Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.12.003>

Kang H, Shin M, Yang J. (2002). Preparation and characterization of hydrophobically modified alginate. *Polymer Bulletin*, 47(5), 429–435.

kara S. (2010). préparation des copolymères hydrosolubles à base d'amidon, modification et contrôle des propriétés. *Thèse de Magister En Chimie*, Université Abou-bakr Belkaid-tlemcen.

Kareb O, Gomaa A, Champagne C, Jean J, Aïder M. (2017). Electro-activation of sweet defatted whey: Impact on the induced Maillard reaction products and bioactive peptides. *Food Chemistry*, 221, 590–598.

Karim A, Bhat R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 563–576.

Keenan T. (1998). La Macromolécule de Gélatine. *Éd Ellipse, Paris, Chap, 16*, 92–111.

Kim J, Lee Y. (2008). Effect of reaction pH on enolization and racemization reactions of glucose and fructose on heating with amino-acid enantiomers and the formation of melanoidins as a result of the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 108, 582–592.

Kitts D, Chen X, Jing H. (2012). Demonstration of antioxidant and anti-inflammatory bioactivities from sugar-amino acid maillard reaction products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(27), 6718–6727.

Kuakpetoon D, Wang Y. (2001). Characterization of different starches oxidized by hypochlorite. *Starch-Stärke*, 53(5), 211–218.

Kuila S, Ray S. (2014). Dehydration of dioxane by pervaporation using filled blend membranes of polyvinyl alcohol and sodium alginate. *Carbohydrate Polymers*, 101, 1154–1165.

L

Laroque D, Inisan C, Berger C, Vouland É, Dufossé L, Guérard F. (2008). Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity. *Food Chemistry*, 111(4), 1032–1042.

Laurienzo P. (2010). Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications : An Overview,

2435–2465.

Ledl F, Erwin S. (1990). New Aspects Of The Maillard Reaction In Foods And In The Human Body. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 29(6), 565–594.

Lertittikul W, Benjakul S, Tanaka M. (2007). Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–glucose model system as influenced by pH. *Food Chemistry*, 100(2), 669–677.

Liang C, Yuan F, Liu F, Wang Y, Gao Y. (2014). Structure and antimicrobial mechanism of ϵ -polylysine-chitosan conjugates through Maillard reaction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 427–434.

Li C, Liu F, Gong Y, Wang Y, Xu H, Yuan F, Gao Y. (2014). Investigation into the Maillard reaction between ϵ -polylysine and dextran in subcritical water and evaluation of the functional properties of the conjugates. *LWT - Food Science and Technology*, 57(2), 612–617.

Lievonen S, Laaksonen T, Roos Y. (2002). Nonenzymatic Browning In Food Models In The Vicinity Of The Glass Transition: Effects Of Fructose, Glucose, And Rylose as reducing Sugar. *J. Agric. Food Chem*, 50, 7034-7041.

Liu Q, Kong B, Han J, Sun C, Li P. (2014). Structure and antioxidant activity of whey protein isolate conjugated with glucose via the Maillard reaction under dry-heating conditions. *Food Structure*, 1(2), 145–154.

Liu Q, Li J, Kong B, Jia N, Li P. (2013). Antioxidant capacity of maillard reaction products formed by a porcine plasma protein hydrolysate-sugar model system as related to chemical characteristics. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 23(1), 33–41.

Li Y, Lu F, Luo C, Chen Z, Mao J, Shoemaker C, Zhong F. (2009). Functional properties of the Maillard reaction products of rice protein with sugar. *Journal of Food Chemistry*, 117(1), 69–74.

Luo Y, Ling Y, Wang X, Han Y, Zeng X, Sun R. (2013). Maillard reaction products from chitosan-xylan ionic liquid solution. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 835–841.

M

Machiels D, Istasse L. (2002) . La Réaction De Maillard : Importance Et Applications En Chimie Des Aliments. *Ann. Méd. Vét*, 6(146), 347–352.

Manzocco L, Calligaris S, Mastrocola D, Nicoli M., Lericci C. (2000). Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science and Technology*, 11(9–10), 340–346.

Martins S, Van Boekel M.. (2005). Kinetics of the glucose/glycine Maillard reaction pathways: influences of pH and reactant initial concentrations. *Food Chemistry*, 92(3), 437–448.

Matmaroh K, Benjakul S, Tanaka M. (2006). Effect of reactant concentrations on the Maillard reaction in a fructose-glycine model system and the inhibition of black tiger shrimp polyphenoloxidase. *Food Chemistry*, 98(1), 1–8.

Mazen, F. (2003). Etude de la nucléation et de la croissance de nanocristaux de silicium élaborés par dépôt chimique en phase vapeur pour dispositifs nanoélectroniques. Thèse de Doctorat. INSA. Lyon. France.

Mirshafiey A, Rehm B. (2009). Alginate and Its Comonomer Mannuronic Acid : Medical Relevance as Drugs. In *Alginates: Biology and Applications*, 229–260.

N

Nagao M, Takahashi Y, Yamanaka H, Sugimura T. (1979) . Mutagens In Coffee And Tea. *Mutation Research*, 68, 101–106.

Nooshkam M., Madadlou A. (2016). Microwave-assisted isomerisation of lactose to lactulose and Maillard conjugation of lactulose and lactose with whey proteins and peptides. *Food Chemistry*, 200, 1–9.

Nursten H. (2005). *The Maillard Reaction: Chemistry, Biochemistry and Implications*. U K: Royal Society of Chemistry.

O

Oerther S. (1998). Conception et evaluation de biomateriaux polysaccharidiques pour le comblement de lesions osteochondrales . *Interet de l'association alginate - hyaluronate*. Universite Henri Poincare De Nancy 1.

Ofner C. (1992). The Determination of ϵ Amino Groups in Soluble and Poorly Soluble Proteinaceous Materials by a Spectrophotometric Method Using Trinitrobenzensulfonic acid'. *J.Analytical Biochemistry*, 207, 129–133.

Oliveira F, Coimbra J, de Oliveira E, Zuñiga A, Rojas E. (2014). Food Protein-Polysaccharide Conjugates obtained via the Maillard Reaction: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398(August), 37–41.

P

Phisut N, Jiraporn B. (2013). Characteristics and antioxidant activity of Maillard reaction products derived from chitosan-sugar solution. *International Food Research Journal*, 20(3), 1077–1085.

Popovici C, Saykova I, Tylkowski B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical DPPH. *Revue De Génie Industriel*, 4, 25–39.

R

Radmacher M, Fritz M, Hansma P. (1995). Imaging soft samples with the atomic force

microscope: gelatin in water and propanol. *Biophysical Journal*, 69(1), 264–270.

Ramonaitytė D, Keršienė M., Adams A, Tehrani K, Kimpe N. (2009). The interaction of metal ions with Maillard reaction products in a lactose–glycine model system. *Food Research International*, 42(3), 331–336.

Raymond L, Morin F, Marchessault R. (1993). Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. *Carbohydrate Research*, 246(1), 331–336.

Rbii K, Violleau F, Brambati N, Buchert A, Surel O. (2011). Decrease of available lysine in thermally treated gelatin followed by LC-UV: Influence on molar mass and ability to helixes' formation. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1409–1412.

Redouan E, Emmanuel P, Michelle P, Bernard C, Josiane C, Cédric D. (2011). Evaluation of antioxidant capacity of ulvan-like polymer obtained by regioselective oxidation of gellan exopolysaccharide. *Food Chemistry*, 127(3), 976–983.

Renn P, Sathe S. (1997). Effect Of pH, Temperature, And Reactant Molar Ratio on Leucine And Dglucose Maillard Browning Reaction In An aqueous System. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3782-3787.

Riquelme N, Díaz-Calderón P, Enrione J, Matiacevich S. (2015). Effect of physical state of gelatin-plasticizer based films on to the occurrence of Maillard reactions. *Food Chemistry*, 175, 478–484.

S

Sadeghi M., Heidari B. (2011). Crosslinked Graft Copolymer of Methacrylic Acid and Gelatin as a Novel Hydrogel with pH-Responsiveness Properties, 543–552.

Sarika P, James N. (2016). Polyelectrolyte complex nanoparticles from cationised gelatin and sodium alginate for curcumin delivery. *Carbohydrate Polymers*, 148, 354–361.

Srinivasan S, Jayasree R., Chennazhi K, Nair S, Jayakumar R. (2012). Biocompatible alginate / nano bioactive glass ceramic composite scaffolds for periodontal tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 274–283.

Summa C, McCourt J, Cämmerer B, Fiala A, Probst M., Kun S, Wagner K. (2008). Radical scavenging activity, anti-bacterial and mutagenic effects of Cocoa bean Maillard Reaction products with degree of roasting. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(3), 342–351.

Su J, Huang Z, Xiao-yan Y, Xin-yu W. (2010). Structure and properties of carboxymethyl cellulose / soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. *Carbohydrate Polymers*, 79(1), 145–153.

T

Tanioka A, Miyasaka K, Ishikawa K. (1976). Reconstitution of collagen-fold structure with

stretching of gelatin film. *Biopolymers*, 15(8), 1505–1511.

Tressl R, Georg T, Wondrak L. (1998). Pentoses And Hexoses As Sources Of New Melanoidin-Like Maillard Polymers. *J. Agric. Food Chem*, 46(5), 1765–1776.

V

Vhangani L, Wyk J. (2013). Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) derived from fructose-lysine and ribose-lysine model systems. *Food Chemistry*, 137(1–4), 92–8.

Y

Yaylayan V. (1992). Maillard Reaction And Formation Of Heterocyclic Flavor Compounds In Food. *Chimie de Spécialités*. 83–109.

Yaylayan V, Ismail A, Huyghues-Despointes A. (2005). Investigation of the Acyclic Forms of Reducing Sugars and Amadori Products by {FTIR} Spectroscopy. *Maillard Reactions in Chemistry, Food and Health*. Woodhead Publishing Ltd.

Z

Zandi M., Mirzadeh H., Mayer C. (2017). Effects of Concentration, Temperature, and pH on Chain Mobility of Gelatin during the Early Stages of Gelation. *Iranian Polymer Journal*, 12.

Zhang H, Zhang Y, Bao E, Zhao Y. (2016). Preparation, characterization and toxicology properties of ??- and ??-chitosan Maillard reaction products nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 287–296.

Zhang J, Xue Z, Cheng H, Huang F, Zhuo R, Zhang X. (2011). Fabrication of lactobionic-loaded chitosan microcapsules as potential drug carriers targeting the liver. *Acta biomaterialia*, 7(4), 1665-1673.

ANNEXES.

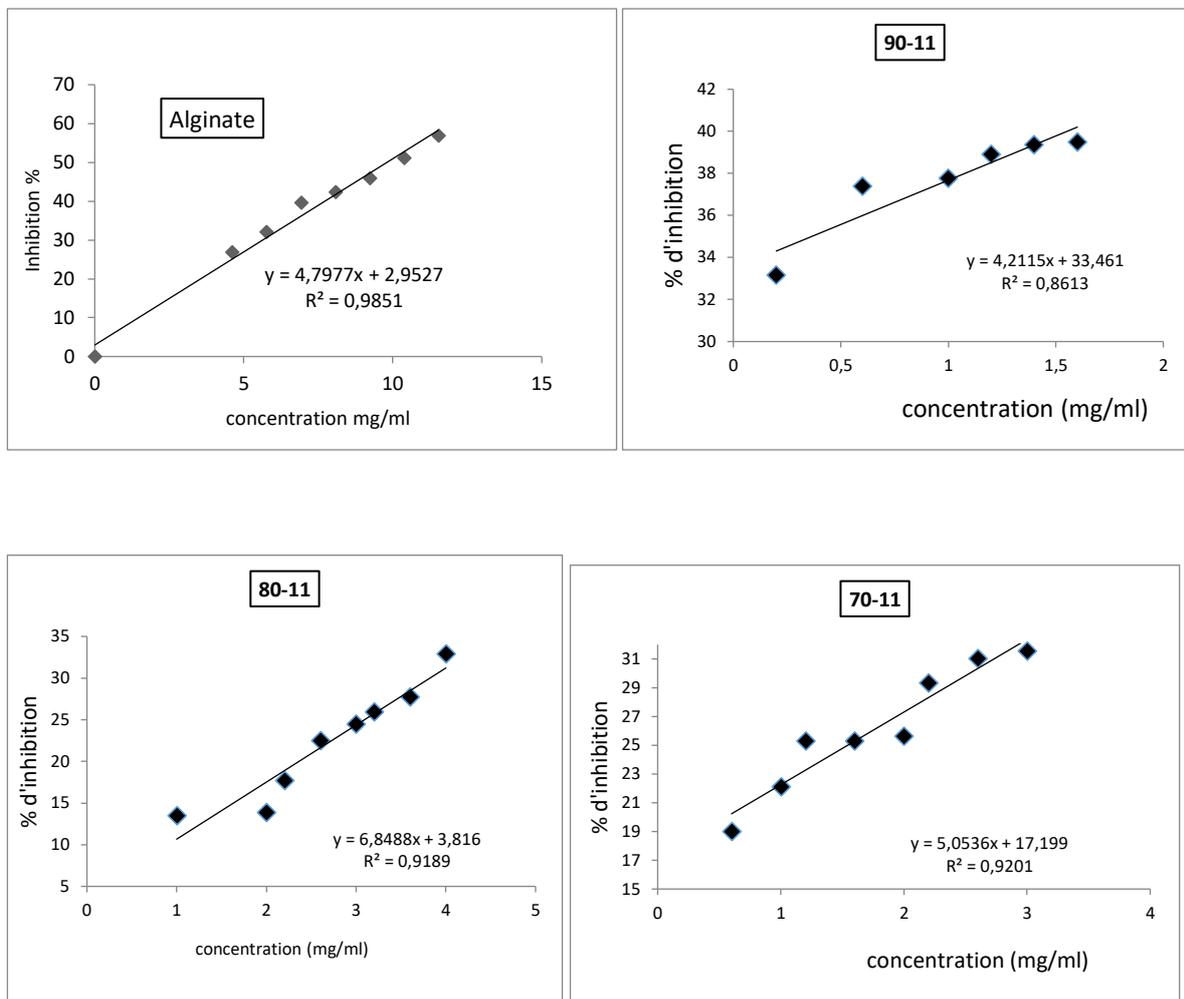


Figure A.1: Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des différents films.

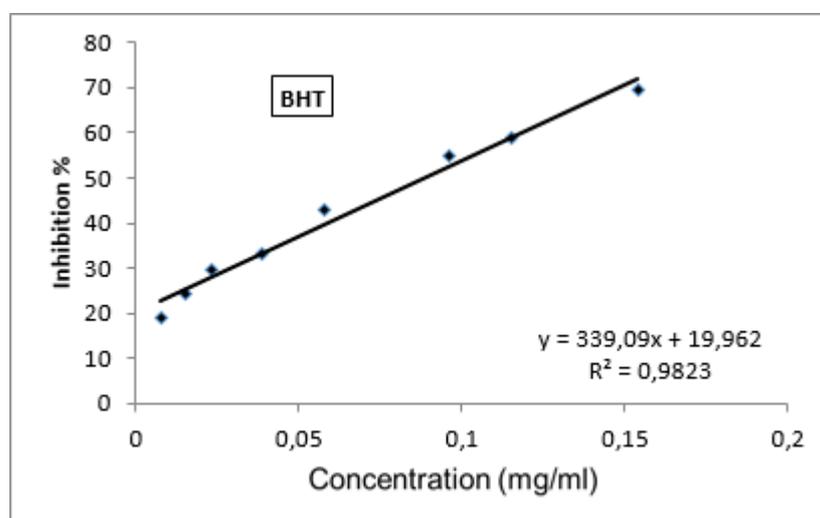


Figure A.2: Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration du BHT.

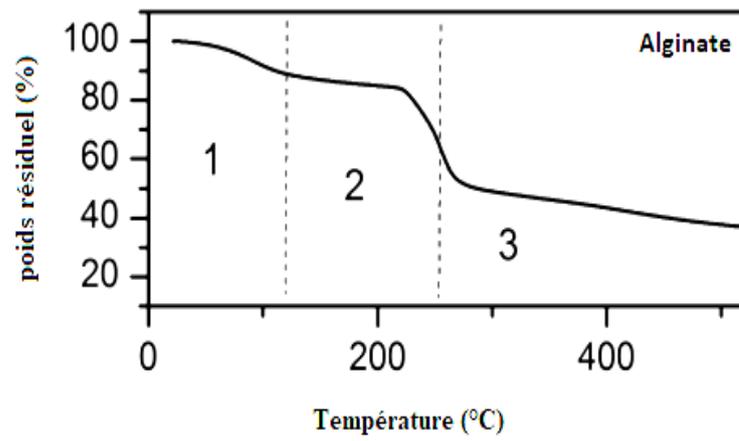
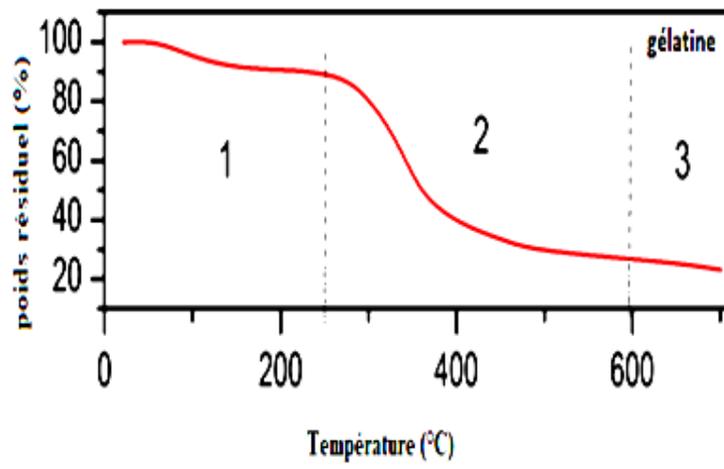


Figure A.3 : Thermogrammes TG de l'alginate et la gélatine.

Travaux scientifiques réalisés

Publications internationales :

Loucif, K., Chetouani, A., Bounkhel, M., Elkolli, M. (2017). Alginate/gelatin crosslinked system through Maillard reaction: preparation, characterization and biological properties. *Polymer Bulletin*, 74(12), 4899–4919.

Communications internationales :

Loucif khadidja, Bounkhel Mahmoud, Elkolli Meriem. « conception de nouveau matériaux biopolymère à base d'alginate » 1re séminaire internationale de pharmacie de sétif (SIPS2016), 11, 12 mai 2016 sétif,.

Communications nationales:

Loucif Khadidja. Workshop on research paper authorship and english technical writing 09-10 décembre 2012 sétif,

Loucif khadidja, Bounkhel Mahmoud, Elkolli Meriem « modification chimique de polysaccharides et conception de nouveaux hydrogels », 4eme journée du doctorant (JD'14) ,08 mai 2014, sétif,

Loucif Khadidja, Djerbouaa Ferhat. « Conception d'un nouvel matériau polymère à base d'amidon et de polyoles », Séminaire national sur les matériaux- procédés et environnement, 11 et 12 mai 2014 Boumerdès,

Loucif Khadidja, El Kolli Meriem.« Modification et élaboration de nouveaux biomatériaux à partir de polysaccharides oxydés/protéine », 5^{ème} journée du doctorant (JD'15), 07 mai 2015 sétif,

Encadrement de mémoires de fin d'études en licence:

2013-2014 : « Revue générale sur les alginates et leurs applications ».

2014-2015 : « Les protéines et les polysaccharides ».

الملخص :

يهدف البحث إلى تعديل الجينات كيميائياً بطريقتين مختلفتين. الأولى أكسدة الجينات الصوديوم في وجود هيبوكلوريت الصوديوم كعامل مؤكسد. والثاني يتعلق بتحضير رقائق جديدة مشكلة من الجينات/ جيلاتين باستخدام تفاعل مايلارد. كمية الألدريد والكربوكسيل الناتجين عن الأكسدة الجزئية للجينات الصوديوم تم تحديدها عن طريق المعايرة باستعمال طريقتي هيدروكسيل الأمين والمعايرة حمض-أساس على الترتيب. تمت متابعة سير تفاعل مايلارد بواسطة الأشعة فوق البنفسجية و ب قياس شدة الاحمرار، كما تم تحديد المجموعات الأمينية الحرة، وفحص البروتين بواسطة الحمض (BCA)، كذلك تم حساب عدد مولات المجموعات الأمينية و تقييم معدل التشابك بواسطة (TNBS). تم تمييز و تحديد الرقائق المحضرة سلفاً بواسطة XRD, TGA, FT-IR. كما حدد الشكل المورفولوجي لها بتقنية AFM. أظهرت جميع المواد المحضرة نشاطاً ضد تشكل الجذور، قوة الارجاع و التوافق مع الدم. كما أشار النشاط المضاد للالتهابات إلى أن المواد المحضرة تمتلك القدرة على تثبيط تمسخ البروتينات. وفقاً لاختبار مضاد للجراثيم، أظهرت هذه المواد خاصية تثبيط نمو لثلاثة أنواع من البكتيريا المستخدمة. (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785).

الكلمات المفتاحية: الجينات الصوديوم، الأكسدة، الجيلاتين، الخصائص الفيزيوكيميائية، تفاعل مايلارد، الأنشطة البيولوجية.

* * * * *

Résumé:

Ce travail a pour but d'étudier la modification chimique de l'alginate de sodium par deux méthodes. La première est consacrée à la réaction d'oxydation de ce polysaccharide en présence de l'hypochlorite de sodium comme agent d'oxydation. La deuxième concerne la préparation de nouveaux films alginate/gélatine en faisant appel à la réaction de Maillard. Des méthodes de dosage par l'hydroxylamine et acido-basique ont été utilisées pour quantifiés respectivement les groupements aldéhydes et carboxyles après oxydation. Le suivi de la réaction de Maillard a été établi : UV-Vis de l'intensité de brunissement, la détermination des amino-groupes libres, le dosage des protéines par l'acide Bicinchoninique (BCA), le calcul des nombres de moles des ϵ -amino groupes et l'évaluation du taux de réticulation par le TNBS. La caractérisation des nouveaux matériaux est faite par IR-TF et DRX. La morphologie a été déterminée par l'AFM. Toutefois, les comportements biologiques des nouveaux biomatériaux ont été investigués par différentes études comme la détermination de l'activité antioxydante qui a montré que les matériaux testés possèdent des pouvoirs anti-radicalaire. Le test d'hémocompatibilité a révélé quant à lui que les composés testés *in vitro* sont non hémolytiques. L'activité anti-inflammatoire a indiqué que les matériaux possèdent une aptitude à inhiber la dénaturation des protéines. Il s'est avéré aussi que les différents composés manifestent une inhibition de la croissance des trois souches bactériennes différentes (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Mots clés : alginate de sodium, oxydation, gélatine, propriétés physicochimiques, réaction de Maillard, activités biologiques.

* * * * *

Abstract:

This work aims to study the chemical modification of sodium alginate by two different ways: Partial oxidation of polysaccharide in the presence of sodium hypochlorite. The latter, is to prepare new alginate / gelatin films by means of Millard reaction. Hydroxylamine and acid-base assay methods were used to quantify the aldehyde and carboxyl groups of oxidized sodium alginate, respectively. Monitoring of the Millard reaction was established by UV-Vis of the intensity of browning, determination of free amino-groups and protein (titration with BCA), calculation the number of moles of ϵ -amino groups and evaluation the rate of crosslinking are established. The obtained hydrogels were characterized and identified by means of FT-IR, XRD and TGA. The morphology was determined by SEM. All these materials showed an antiradical activity and reducing power. The hemocompatibility test revealed that *in vitro* compounds are non-hemolytic. Also, these materials indicate an anti-inflammatory activity by inhibition of the denaturation of protein. According to antibacterial test, the hydrogels exhibit an inhibition of the growth of three different bacterial strains (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Key words: sodium alginate, oxidation, gelatin, physicochemical properties, Maillard reaction, biological activities.