

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل
Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement
du Littoral



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU
DIPLOME D'INGENIEUR EN SCIENCES DE LA MER**

OPTION : AQUACULTURE

Thème :

**Extraction de biopolymères chitineux d'intérêt
pharmacologique à partir de sous-produits de la pêche**

Présenté par :

- ❖ HAMMI Thiziri
- ❖ ZEMMOURI Mohamed Salah

Soutenu le : 29/09 /16 devant le jury suivant :

Mme ALOUACHE S.	Maître conférence A	(ENSSMAL)	Présidente
Mme CHERNAI HAMDI S.	Maître conférence A	(ENSSMAL)	Examinatrice
Mme AMAROUCHE N.	Maître assistante A	(ENSSMAL)	Examinatrice
Mr NABTI B.	Maître assistant A	(Faculté de Pharmacie)	Invité
Mr HAMDI B.	Professeur	(ENSSMAL)	Encadreur

Année universitaire : 2015-2016

« Vivez comme si vous deviez mourir demain.

Apprenez comme si vous deviez vivre toujours. »

Mahatma GANDHI (1883–1944)

Remerciements

C'est grâce aux conseils et orientations de membres universitaires compétents que ce travail a été élaboré. A cet effet, il nous est agréable de leur présenter nos remerciements ainsi que l'expression de notre plus profond respect.

En premier lieu, nous voudrions remercier Mr HAMDI Boualem, Professeur à l'ENSSMAL, pour avoir encadré ce travail et partagé ses connaissances et son savoir-faire. Nous le remercions vivement pour sa disponibilité, ses critiques constructives, son regard méthodique et surtout pour la chance qu'il nous a donné d'élargir notre horizon scientifique.

Nos sincères remerciements vont au Dr ALOUACHE Souhila, pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant la présidence du jury. Nous lui adressons toute notre gratitude.

Nous remercions Dr CHERNAI HAMDI Safia et Mme AMAROUCHE Nassima de l'attention qu'elles portent à ce travail en acceptant de l'examiner.

Nous remercions vivement Mr NABTI Bachir, Maitre-Assistant A à la Faculté de pharmacie, Université Alger 1, de nous faire honneur de sa présence.

Nous tenons à remercier le personnel du laboratoire de Sidi Fredj pour avoir mis à disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce mémoire. Plus précisément, nous remercions Mme Nabila EDDALYA pour ses précieuses remarques et explications, pour son énergie et implication dans ce mémoire ainsi que pour son sens de partage de connaissances scientifiques et Mr M.Boudjellal pour son volontarisme et ses compétences.

Pour leur aide technique et scientifique, ainsi que leur chaleureux accueil au laboratoire de chimie de l'ENSSMAL, nous remercions : Sid Ahmed pour ses connaissances bibliographiques et son volontarisme, Nadia pour différentes raisons (humaines et techniques) ... vous avez tous apporté une touche agréable à notre environnement, tant pour la bonne humeur que pour les idées.

A nos amis, Ibtissem, Sabrina, Fella, Amine... merci d'être venus nous soutenir le jour J, merci à tous les autres (Kassia, Karim....) pour leurs encouragements.

Enfin, nous tenons à remercier nos familles et en particulier nos parents qui nous ont toujours encouragé et soutenu inconditionnellement dans notre parcours universitaire, comme dans la vie.

I. Liste des tableaux :

Tableau I.1 : capture de <i>parapenaeus longirostris</i> en fonction des années (FAO,2009)	21
Tableau I.2 : Sources potentielles de chitine (Tolaimate et al, 2003).....	25
Tableau I.3 : composition des carapaces de quelques crustacés (Source Ifrance in Keddou, 2008)....	26
Tableau I.4 : Taux d’inhibition de quelques souches fongiques en fonction de la concentration du chitosane (Laflamme et al., 1999).....	28
Tableau I.5 : Applications du chitosane (adapté de Rinaudo, 2006)	39
Tableau II.6 : Etapes de l’extraction chimique de la chitine	53
Tableau III.7 : Taux d’humidité dans la matière	66
Tableau III.8 : Taux de cendres dans la matière première	66
Tableau III.9 : Les longueurs d’ondes et leurs attributions pour les principales bandes obtenues pour la chitine standard et la chitine extraite (Pawlak et al. 2003)	68
Tableau III.10 : Les longueurs d’ondes et leurs attributions pour les principales bandes obtenues pour le chitosane standard et le chitosane préparé	70
Tableau III.11 : Taux d’humidité dans la poudre de diatomite	77
Tableau III.12 : Composition chimique de la Diatomite naturelle	77
Tableau III.13 : variation de l'absorbance en fonction de la concentration	78
Tableau III.14 : concentration de la tétracycline dissoute à partir de la formule tétracycline - Chitosane- Agar-agar -Diatomite en fonction de l’absorbance et du temps	81
Tableau III.15 : concentration de la tétracycline dissoute à partir de la formule tétracycline – Chitosane- Agar-agar en fonction de l’absorbance et du temps	82
Tableau 16 : Comparaison de la production de chitine provenant de différentes sources selon Tolaimate et al.....	98

II. Liste des figures :

Figure I.1 : Evolution de la production mondiale de la pêche et de l'aquaculture de crevettes (Source FAO, 2012)	20
Figure I.2 : <i>Parapenaeus longirostris</i> (Lucas, 1846).....	22
Figure I.3 : structure moléculaire de la chitine (Wang et Uchiyama, 2013).....	25
Figure I.4 : structure moléculaire du chitosane (Wang et Uchiyama, 2013).....	27
Figure I.5 : Arrangement des trois formes existantes de chitine: α , β et γ	30
Figure I.6 : Système orthorhombique	31
Figure I.7 : illustration schématique de la polyvalence du chitosane (Kumirska et al., 2011).....	32
Figure I.8 : Chitine et dérivés de la chitine (Le Roux, 2012).....	33
Figure I.9 : Procédé de fabrication de la chitine et du chitosane	35
Figure I.10 : Désacétylation de la chitine par traitement enzymatique	36
Figure I.11 : Désacétylation de la chitine par traitement chimique (Coelho et al., 2010).....	36
Figure I.12 : Diatomées centriques (Erhat,1973)	44
Figure I.13 : Diatomées pennées (Erhat, 1973).....	44
Figure II.14 : Crevette blanche : <i>parapenaeus longirostris</i>	49
Figure II.15 : Lyophilisateur.....	50
Figure II.16 : Broyage des carapaces de crevettes au Blender	50
Figure II.17 : Fragments obtenus après tamisage des carapaces de crevettes	51
Figure II.18 : Chitine produite en laboratoire	54
Figure II.19 : Production du chitosane par autoclave.....	55
Figure II.20 : Chitosane produit en laboratoire	55
Figure II.21 : Préparation de la solution de chitosane	57
Figure II.22 : Solution de chitosane... ..	57
Figure II.23 : Diatomite.....	58
Figure II.24 : Broyage de la diatomite à l'aide d'un mortier en porcelaine	58
Figure II.25 : Tamisage à l'aide d'un tamis en INOX	58
Figure II.26 : Etapes d'élimination de la silice quartz de la poudre de diatomite	59
Figure II.27 : Extracteur Soxhlet	60
Figure II.28 : Extraction de la calcite contenue dans la poudre de diatomite	60
Figure II.29 : Réalisation des comprimés	62
Figure II.30 : Comprimés à base de Chitosane-tétracycline et agar_agar	62
Figure II.31 : Solution mère de tétracycline	63
Figure II.32 : Solutions filles de tétracycline	63
Figure II.33 : Spectrophotomètre UV-Visible	64
Figure II.34 : Bain thermostaté avec agitation	64
Figure III.35 : Spectre IR de la chitine extraite	67
Figure III.36 : Spectre IR de la chitine standard (Brugneroto et al., 2001).....	67
Figure III.37 : Spectre IR du chitosane produit.....	69
Figure III.38 : Spectre IR du chitosane de référence (Puvvada et al ., 2012).....	69
Figure III.39 : Spectre IR du chitosane produit.....	71
Figure III.40 : Spectre IR de la chitine produite ; Bande correspondant à l'amide I (en rouge) et à l'amide II (en bleu).....	72
Figure III.41 : Images MEB de la chitine à faible grossissement.....	73
Figure III.42 : Images MEB de la chitine extraite à grossissement moyen.....	73
Figure III.43 : Images MEB de la chitine extraite à fort grossissement	74
Figure III.44 : Images MEB du chitosane à faible grossissement.....	75
Figure III.45 : Images MEB du chitosane à grossissement moyen.....	75
Figure III.46 : Images MEB du chitosane à fort grossissement.....	76
Figure III.47 : Courbe d'étalonnage de la tétracycline à différentes concentrations.....	79

Figure III.48 : courbe de dissolution de la tétracycline à partir de formule développée tétracycline – chitosane- Agar_agar – Diatomite	81
Figure III.49 : courbe de dissolution de la tétracycline à partir de formule développée tétracycline Chitosan	82
Figure III.50 : superposition des courbes de dissolution de la tétracycline à partir de la formule développéeTétracycline – Chitosane – Agar-agar -Diatomite (en bleu) et à partir de la formule tétracycline – ChitosaneAgar-agar (en rouge)	83
Figure 51 : Evolution du nombre de publications ayant rapport au chitosane.....	98
Figure 52 : Présence de la silice sur les diatomées.....	99

III. Liste des formules :

(1) : Equation pour le calcul du degré d'acétylation de la chitine	29
(2) : Réaction de dissolution des carbonates de calcium dans le HCL	33
(3) : Equation de la teneur en humidité	51
(4) : Equation de la teneur en cendres	51
(5) : Equation pour le calcul du degré de désacétalation de la chitine.....	71

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

CRAPC	Centre de recherche en analyse physico-chimique
DA	Degré d'acétylation
DD	Degré de désacétylation
DP	Degré de polymérisation
DPRH	Direction de la Pêche et des Ressources Halieutiques
FTIR	Infra Rouge à Transformée de Fourier
GLU	Glucosamine
IPEC	International Pharmaceutical Excipient Council
IR	Infrarouge
MEB	Microscopie électronique à balayage
N.AG	N-acétyl-D-glucosamine
NacGlu	N-acétylglucosamine
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Principe Actif
pH	Potentiel Hydrogène
pKa	Constante d'acidité
PM	Poids Moléculaire
RX	Rayon X
UV	Ultraviolet

Unités et Symboles :

M	Masse
KDa	Kilodalton
KV	Kilovolt
µm	Micromètre
MDa	Monochrome display adapter

SOMMAIRE

Liste des tableaux.....	III
Liste des figures.....	IV
Listes des formules.....	VI
Liste des abréviations.....	VII
Introduction générale.....	16
 Chapitre I : Recherche Bibliographique	
Section 1. Contexte biologique.....20	
I. Valorisation des coproduits de crustacés : la production de chitine.....	20
II. La crevette <i>parpenaeus longirostris</i> : Source de la chitine.....	21
II.1. Description générale.....	21
II.2. Répartition générale et habitat	22
II.3. Pêche de l'espèce en Méditerranée.....	22
II.6. Pêche de l'espèce en Algérie.....	23
 SECTION 2. Structure macromoléculaire des biopolymères de chitine et de chitosane : de l'extraction aux propriétés physico-chimiques en solution.....24	
I. Généralités sur la chitine	24
I.1. Historique.....	24
I.2. Définition générale.....	24
I.3. Structure de la chitine.....	24
I.4. Les ressources pour la production de chitine.....	25
I.5. Organisation de la cuticule de crustacés.....	25
II. Généralités sur le chitosane : Principal dérivé de la chitine.....	26
II.1. Définition.....	26
II.2. Source et origine.....	27
II.3. Le chitosane en quelques chiffres.....	27
II.4. Production mondiale du chitosane.....	27

II.5. Propriétés biologiques du chitosane.....	28
II.5.1. Biocompatibilité.....	28
II.5.2. Biodegradabilité.....	28
II.5.3. Propriétés bactériologiques et fongistiques.....	28
III. Propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane.....	29
III.1. Le degré de désacétylation ou degré d'acétylation.....	29
III.2. La viscosité.....	29
III.3. La structure cristalline.....	30
III.3.1. La structure cristalline de la chitine.....	30
III.3.2. La structure cristalline du chitosane.....	31
III.4. La solubilité.....	31
III.5. La masse molaire.....	32
IV. La production de chitine et de ses dérivés.....	32
IV.1. Les dérivés de la chitine.....	32
IV.2. Méthodes de production de la chitine et du chitosane.....	33
IV.2.1. Purification de la chitine.....	33
IV.2.2. Méthodes d'élaboration du chitosane.....	35
IV.2.2.1. Traitement enzymatique.....	35
IV.2.2.2. Traitement chimique.....	36
V. Les domaines d'applications de la chitine et de ses dérivés	37
V.1. Domaine médical et pharmaceutique.....	38
V.2. Domaines industriel et environnemental	38
SECTION 3 .Médicaments et système de libération du principe actif : Système de relargage contrôlé à base de chitosane	40
I. Définition d'un médicament.....	40
I.1. Composition d'un médicament.....	41
I.1.1. Principe actif.....	41
I.1.2. Les excipients.....	41

I.1.2.1. Définition et classification.....	41
I.1.2.2. Rôle des excipients.....	42
I.1.2.3. Choix des excipients.....	42
I.1.2.3.1.Le chitosane comme excipient.....	42
I.1.2.3.2.La diatomite comme excipient	43
I.1.2.3.3. L'agar comme excipient	44
I.4.Interactions principes actifs/excipients.....	44
II. Relargage de principes actifs pharmaceutiques.....	45
II.1.Libération du principe actif	45
II.2.Dissolution du principe actif.....	45
II.3.Absorption du principe actif	45
Chapitre II : Matériels et Méthodes expérimentales	
I. Matériel utilisé	47
I.1. Petit matériel	47
I.2. Appareillage	47
I.3. Matériaux	47
I.4. Produits chimiques	48
II. Extraction de la chitine de la carapace de crevettes et production du chitosane	49
II.1. Identification et préparation de la matière première	49
II.1.1. Source de carapaces	49
II.1.2. Prétraitement des carapaces	49
II.1.3. Lyophilisation	49
II.1.4. Broyage	50
II.1.5. Tamisage	50
II.1.6. Caractérisation des poudres de carapaces	51
II.1.6.1. Matière sèche	51
II.1.6.2. Teneur en cendres	51
II.2. Production de la chitine et du chitosane	52
II.2.1. Extraction chimique de la chitine	52

II.2.2. Production du chitosane par méthode chimique	54
II.2.2.1. Production du chitosane par autoclave	54
II.3. Caractérisation qualitative des produits	55
II.3.1. Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier	55
II.3.2. Microscopie électronique à balayage	56
III. Système polymère – médicament.....	56
III.1. Préparation de la solution de chitosane	56
III.2. Traitement de la diatomite	57
III.2.1. Origine de la diatomite utilisée	57
III.2.2. Broyage de la diatomite	58
III.2.3. Tamisage	58
III.2.4. Elimination de la silice quartz	59
III.2.5. Extraction de la calcite	59
III.2.6. Caractéristiques physico-chimiques de la diatomite	60
III.2.6.1. Teneur en humidité	60
III.2.6.2. Composition chimique	61
III.3. Réalisation des comprimés	61
III.3.1. Préparation du composite Tétracycline- Diatomite -Chitosane- Agar_agar.....	61
III.3.2. Préparation du composite Tétracycline- Chitosane- Agar_agar	62
III.4. Cinétique de libération du principe actif	63
III.4.1. Préparation des solutions étalons de tétracycline	63

III.4.2. Cinétique de relargage de la tétracycline	64
III.4.2.1. Composite Diatomite – Chitosane- Agar_agar et Tétracycline.....	64
III.4.2.2. Composite Chitosane – Agar_agar et Tétracycline	64

Chapitre III. Résultats et discussions

I.Echantillon de chitine et de chitosane	66
I.1. Composition de la matière première	66
I.1.1. Matière sèche	66
I.1.2. Teneur en cendres	66
I.2. Méthodes d’analyses	66
I.2.1. Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier- FTIR	66
I.2.1.1. La chitine extraite et la chitine standard	67
I.2.1.2. Le chitosane produit et le chitosane standard	69
I.2.1.3. Détermination du degré de désacétylation par spectroscopie FTIR	71
I.2.1.4. Détermination de la forme polymorphique de la chitine par spectroscopie FTIR	72
I.2.2. Microscopie électronique à balayage MEB.....	72
I.2.2.1. Chitine extraite.....	73
I.2.2.2. Chitosane produit.....	75
II. Echantillon de diatomite	77
II.1. Caractéristiques chimiques et physicochimiques	77
II.1.1. Teneur en humidité.....	77
II.1.2. La composition chimique	77

III. Cinétique de relargage du principe actif	78
III.1. Détermination de la courbe d'étalonnage.....	78
III.2. Etude de variation de la masse libérée du principe actif	79
III.3. Résultats de dissolution in vitro	80
III.3.1. Composite Tétracycline – Chitosane- Agar_agar- Diatomite	80
III.3.2. Composite Chitosane – Agar_agar et Tétracycline	82
III.3.3. Interprétation des résultats obtenus.....	83
Conclusion	86
Références bibliographiques	89
Annexes	96

Introduction

Introduction générale

Le monde prend conscience que le développement économique suppose une utilisation de plus en plus importante des ressources fossiles « tarissables ». Cette utilisation massive compromet l'environnement par la pollution, elle met en péril la biodiversité mettant en danger notre existence. Quelques décennies ont suffi pour voir se développer d'une manière intensive des dérivés du pétrole dont beaucoup de polymères devenus indispensables dans la vie aussi bien professionnelle que de tous les jours. Utilisés aussi bien en industrie qu'en agriculture pour des utilités diverses et des applications multiples, il serait aujourd'hui impossible à un individu d'imaginer une vie sans polymères. Les polymères issus du pétrole, ne sont pas biodégradables leur recyclage est aussi désastreux pour l'environnement que leur fin de vie, de plus ils ne sont pas économiquement rentable ; d'où l'idée de trouver des ressources naturelles de substitution, renouvelables et biodégradables à celles épuisables, nocives et polluantes.

Parmi les matières premières bon marché, renouvelables et non nocives pour l'environnement, on peut citer les matériaux issus des ressources marines, en particulier la chitine et son principal dérivé le chitosane (Crini et al., 2009). En effet, le nombre de publications scientifiques ayant trait au chitosane connaît une progression exponentielle depuis maintenant une trentaine d'années (Voir : La recherche concernant la chitine et ses dérivés – Annexe 01).

Présente dans de nombreux organismes vivants, la chitine est le polysaccharide le plus abondant dans la nature après la cellulose. La chitine et le chitosane, obtenu par des réactions de désacétylation de la chitine, sont extraits des carapaces des crustacés telles que la crevette et le crabe.

Avec une production totale de 6 millions de tonnes en 2014, la crevette constitue le produit de la mer le plus valorisé sur le marché mondial, pêche et aquaculture confondues (FAO, 2014). Destinée dans sa totalité à l'alimentation humaine, sa partie comestible représente près de 60% de son poids. Une grande part de la production fait alors l'objet d'une transformation industrielle telle que l'étêtage et le décorticage. Cette transformation génère des coproduits (têtes, carapaces et queues) dont le devenir pose des problèmes aux industriels. La majeure partie est rejetée, dans l'environnement, ce qui présente des risques de pollution et des dangers pour la santé.

La valorisation de ces co-produits présente un double intérêt ; contribuer à préserver l'environnement d'une part et maximiser le profit des entreprises, d'une autre part. Cette valorisation consiste à les transformer de façon à ce qu'ils deviennent des matières premières ou des matières intermédiaires pour la fabrication d'autres produits d'intérêt.

La chitine et le chitosane présentent de nombreuses propriétés physiques, chimiques et biologiques. De nombreux travaux scientifiques ont été conduits sur la chitine et surtout sur le chitosane depuis une vingtaine d'années. Le chitosane a trouvé son utilisation dans divers secteurs, économiquement porteurs, comme les industries cosmétiques, biomédicales ou alimentaires.

Pratiquement, toutes les applications du chitosane sont liées à son caractère polycationique, unique parmi les polymères naturels, d'où sa prédisposition à interagir avec d'autres polymères de charge négative, mais aussi à ses propriétés biologiques comme antioxydant, anti-tumoral, antimicrobien et favorisant le système immunitaire (Kim, 2010). La chitine et le chitosane présentent un intérêt dans le domaine de la libération des médicaments pour leurs excellentes qualités de biocompatibilité, biodégradabilité et non toxicité. De plus, en ce qui concerne l'interaction avec la peau, le chitosane n'est pas un irritant ; Yu et al (1998) l'ont démontré dans une étude dans laquelle ils testent plusieurs polymères.

L'objectif de ce mémoire est :

- d'expérimenter une méthode d'extraction des biopolymères chitineux (Chitine et chitosane) à partir des carapaces de crevettes ;
- d'élaborer de nouveaux systèmes, plus complexes à base de bipolymères permettant une modélisation et un meilleur contrôle de la cinétique de libération des médicaments.

Pour élaborer ces systèmes complexes, nous avons utilisés d'autres additifs d'origine marine comme les diatomites et l'agar agar.

Ce mémoire est structuré en trois chapitres :

1. Le premier chapitre : étude bibliographique, organisée en trois sections :
 - La première section situe le contexte de la filière des coproduits marins sur le marché actuel et la source de la chitine
 - La deuxième section traite des généralités sur les biopolymères ; définitions, structures, propriétés ainsi que leurs procédés d'extraction.
 - La troisième section décrit l'avantage du système polymère-médicament, ainsi que la cinétique de libération du médicament.
2. Le deuxième chapitre est consacré aux produits utilisés, aux méthodes expérimentales de synthèse et aux différentes techniques de caractérisations employées.
3. Le troisième chapitre illustre les résultats obtenus, suivi des interprétations et discussions.

Enfin, une conclusion générale sera formulée. Elle résumera les principaux résultats obtenus lors de ce travail de mémoire et donnera différentes perspectives pour des études futures.

Chapitre I

Recherche bibliographique

Section1. Contexte biologique

La production de crustacés représente 6 millions de tonnes en 2014, soit environ 7% des 167,2 millions de tonnes de production mondiale de poissons (FAO, 2014). La crevette ne figure pas parmi les dix catégories de poisson les plus engendrées. Cependant, c'est le produit marin le plus valorisé sur le marché mondial avec une contribution de 16% en valeur.

La Chine est classée premier producteur de crevettes dans le monde en assurant 41,6% de la production totale, suivie de loin par l'Indonésie et l'Inde avec, respectivement, 8,6% et 8,3% (Gillett, 2008).

La production issue de l'aquaculture de crevettes ne cesse également de se développer : elle représente 41% de la production totale en 2010 (Figure 1).

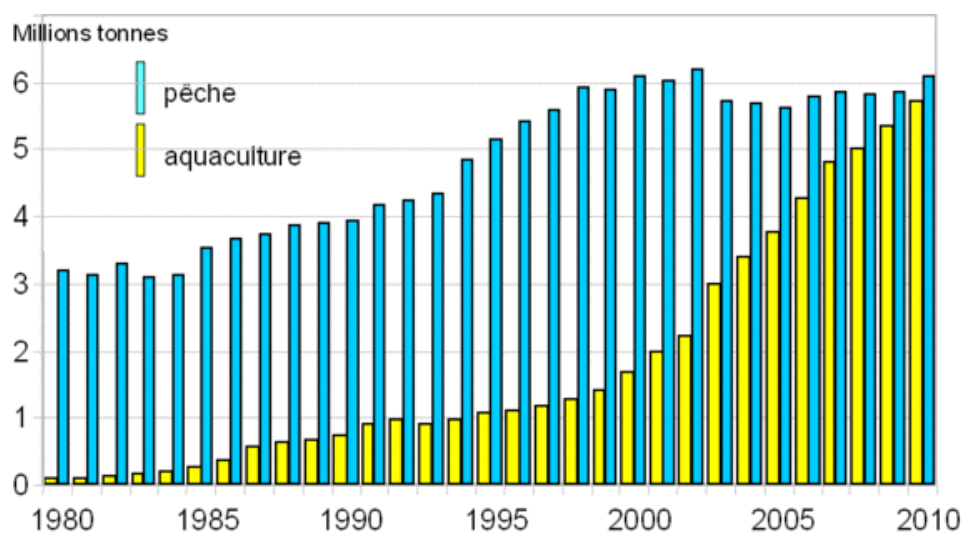


Figure 1 : Evolution de la production mondiale de la pêche et de l'aquaculture de crevettes (Source FAO, 2012)

L'augmentation de la production des crustacés entraîne une augmentation du volume de leurs coproduits. Des plateformes de décorticage de crevettes existent notamment au Maroc et en Asie. Leur principale voie de valorisation est la production de chitine, l'un des composés majoritaires des cuticules de crustacés (Le Roux, 2012).

I. Valorisation des coproduits de crustacés : la production de chitine

Les coproduits de crustacés représentent plus de 60 % du poids frais (Wang et al., 2011). Ce volume constitue une ressource abondante de chitine. Ce polysaccharide ancien constitue l'exosquelette des crustacés. Les domaines d'applications de la chitine et de ses dérivés ne cessent de s'étendre (Le Roux, 2012).

II. La crevette *Parapenaeus longirostris* : Source de chitine

II.1. Description générale

Notre travail porte sur une espèce de la famille des Penaeidae, appelée *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846), commune en Algérie sous le nom de crevette blanche ou crevette rose. Sa capture au niveau mondial, en fonction des années, est représentée dans le tableau 1 :

Tableau 1 : Capture de *parapenaeus longirostris* en fonction des années

Années	Capture (tonnes)
1985	39896
1993	21235
2000	24119
2005	19912
2010	19510
2012	19987
2014	23097

Source FAO, 2016.

❖ Classification de l'espèce

Embranchement	Arthropodes
Sous Embranchement	Antennates
Classe	Crustacés (Pennant, 1777)
Sous Classe	Malacostracés
Super Ordre	Eucaridés
Ordre	Décapodes (Latreille, 1802)
Sous Ordre	Natantia (Burkenroad, 1963)
Infra Ordre	Penaidea (Rafinesque, 1815)
Super Famille	Penaeoidea (Rafinesque, 1815)
Famille	Penaidae (Rafinesque, 1815)
Genre	<i>Parapenaeus</i> (Smith, 1885)
Espèce	<i>Parapenaeus longirostris</i> (Lucas, 1846)

Les crevettes sont des crustacés, dont le corps est comprimé latéralement et muni de cinq paires d'appendices abdominales, appartenant à l'ordre des Décapodes.

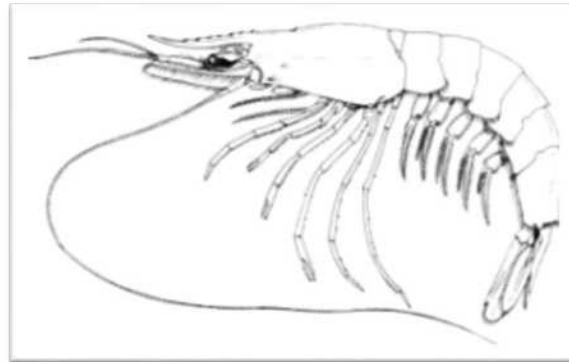


Figure 2 : *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846)

II.2. Répartition générale et habitat

L'aire de distribution de *Parapenaeus longirostris* est étendue, elle se retrouve dans tout le bassin méditerranéen, elle est également répandue dans l'Atlantique oriental ; de l'Angola au Portugal et dans l'Atlantique occidental ; des Guyanes au Massachusetts (USA) (Holthuis, 1987 in Ainouche, 2009). Elle fréquente les fonds de vases et de sables, elle est essentiellement exploitée par les chalutiers.

Parapenaeus longirostris est une espèce demersale qui vit sur des fonds de vases plus ou moins sableuses. En Algérie, elle évolue au niveau du bord supérieur du plateau continental à partir de 100 mètres de profondeur. Elle est fréquente et abondante entre 150 et 300 mètres de jour et de 100 à 300 mètres de nuit, en tenant compte de cette répartition, cette espèce se trouve bien exploitée en Algérie, car elle se situe sur les zones de pêche les plus fréquentées (Grimes et al ., 2004).

II.3. Pêche de l'espèce en Méditerranée

La crevette rose fait l'objet de pêche artisanale au chalut dans toute la Méditerranée. Cette activité revêt une grande importance économique en Italie, en Espagne, au Maroc, en Algérie, en Tunisie et à Chypre. En France, cette espèce est très faiblement représentée dans les captures.

II.4. Pêche de l'espèce en Algérie

En Algérie, les captures de crustacés sont composées de 90% de crevettes, selon les statistiques officielles des services de pêche (DPRH, 2007). En raison de la forte demande sur le marché mondial des crustacés décapodes, les crevettes par leur abondance ainsi que leur haute valeur nutritive et l'exponentielle qualité gastronomique de leur chair, se trouvent très exploitées et occupent une place importante grâce à leur valeur marchande (Grimes et al., 2004). C'est le cas de *Parapenaeus longirostris* qui représente une des espèces la plus commune de la pêcherie méditerranéenne.

Section 2. Structure macromoléculaire des biopolymères de chitine et de chitosane : de l'extraction aux propriétés physico-chimiques en solution.

I. Généralités sur la chitine

I.1. Historique

En 1811, le professeur Henri Braconnot, Directeur du jardin biologique à Nancy (France) à isolé une substance fibreuse d'un certain type de champignon. De plus, il a observé que cette substance n'est pas soluble dans les solutions aqueuses d'acides. Une décennie plus tard, en 1823, la même substance a été trouvée dans certains insectes (coléoptère) ; elle a été par la suite nommée chitine (provient du mot grec "Kitos" qui signifie l'enveloppe) (Muzzarelli et al., 2012).

En 1859, le professeur Charles Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin et a observé ses différentes solubilités. La substance, résultat du traitement alcalin a pu être dissoute dans les acides. Cependant, ce n'est qu'en 1894 que cette substance a été nommée chitosane par Hoppe-Seyler (Jaouen, 1994 *in* Suyatama, 2006).

Ce polymère est un des plus abondants sur Terre après la cellulose, à la fois dans le milieu terrestre et marin (Maeda et al, 2008). Il est traditionnellement extrait à partir des carapaces des crustacés depuis les années 70 pour des domaines d'application variés, tels que la pharmacutique, la cosmétique, la diététique et le traitement des eaux. La production industrielle et l'utilisation de ces deux biopolymères sont en constante augmentation puisque ils se trouvent abondamment dans la nature et sont des ressources renouvelables (Muzzarelli, 1977).

I.2. Définition générale

Dans le règne animal, la chitine est un élément structurel important des téguments de certains invertébrés ; elle n'existe que sous la forme de complexes avec des protéines et des minéraux. Elle est présente principalement dans les coquilles de mollusques, dans les cuticules des insectes et dans la carapace des crustacés (Jeuniaux et Thomé ,1990).

I.3. Structure de la chitine

La chitine est un haut polymère de la N-acétyl-D-glucosamine. C'est un homoglycane linéaire, dans lequel les monomères de N.AG sont liés par des ponts β -(1-4). C'est donc un polysaccharide voisin de la cellulose, mais dont les unités de glucose portent un groupement acetylaminé sur le carbone -2- (Figure 3) qui remplace le groupement alcool retrouvé dans la cellulose (Jeuniaux et Thomé, 1990).

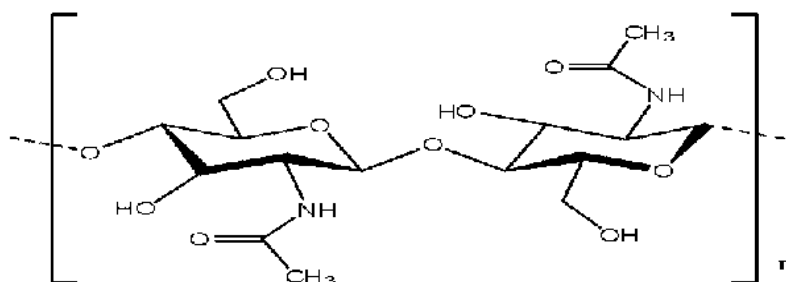


Figure 03 : structure moléculaire de la chitine (Wang et Uchiyama, 2013)

I.4. Les sources de production de chitine

Bien que les sources potentielles de chitine soient très nombreuses (Tableau02), elle est essentiellement produite aujourd'hui à partir des carapaces de crevettes. Elle est également rencontrée dans la structure de la membrane cytoplasmique de certains champignons et algues (Di Mario *et al.* 2008). On la trouve aussi chez les diatomées (Herrera, 1978 *in* Jeuniaux et Thomé, 1990). Pendant longtemps, ces déchets n'étaient pas récupérés et étaient simplement rejetés à la mer après décorticage. La production de chitine permet de valoriser les déchets de l'industrie agroalimentaire tout en évitant leur rejet à la mer, car ceci engendre des problèmes de pollution vu que les carcasses des arthropodes (crustacés, céphalopodes...) sont très résistantes à la biodégradation (Shahidi et Abuzaytoun, 2005).

Tableau 2. Sources potentielles de chitine (Tolaimate et al, 2003)

Sources de chitine	Teneur en chitine (%)
Bernacle (<i>Lepasanatifera</i>)	7
Crabe marbré (<i>Grapsus marmoratus</i>)	10
Crabe rouge (<i>Portunus puber</i>)	10
Crabe araignée (<i>Maia squinado</i>)	16
Homard (<i>Homarus vulgaris</i>)	17
Homard sauterelle (<i>Scyllarus arctus</i>)	25
Langouste (<i>Palinurus vulgaris</i>)	32
Ecrevisse (<i>Astacus fluviatilis</i>)	36
Crevette (<i>Palaemon fabricius</i>)	22
Seiche (<i>sepia officinalis</i>)	20
Calamar (<i>Loligo vulgaris</i>)	40

I.5. Organisation de la cuticule de crustacés

Les cuticules de crustacés sont constituées de chitine, protéines et minéraux (essentiellement le carbonate de calcium). Les proportions sont variables selon les espèces.

Le tableau 03 illustre les quantités que l'on peut trouver selon la source.

Tableau 03 : Composition des carapaces de quelques crustacés (Source Ifrance *in* Keddou, 2008)

COMPOSITION	DECHETS DE CORPS DE CREVETTES (%)	DECHETS DE TETES DE CREVETTES (%)	DECHETS DE LANGOUSTES (%)	DECHETS DE CRABES (%)
CHITINE	27	13.5-17.5	11-15	13-15
PROTEINES TOTAL	40	29-37.5	20-44	30-35
LIBRES	(28)	(20-26)	-	(18-28)
LIEES	(12)	(9-10)	-	(7-12)
CENDRES (CACO3)	33	25-27	40	50
MATIERES SOLUBLES ET AUTRES	0	32.5	4	0-7

Les trois constituants majoritaires, chitine, protéines et CaCO₃, forment un réseau dense. La chitine y joue plusieurs rôles structurels et fonctionnels vitaux. Elle forme une barrière physique entre le corps de l'organisme et son environnement (Roer et Dillaman, 1984 *in* Le Roux, 2012). Elle participe à sa protection contre les radiations, la chaleur et les agressions chimiques et/ou physiques. Elle est également le site d'attachement des muscles et le lieu d'échange et de transport de substances, notamment l'adsorption de composés anioniques. Elle joue également un rôle dans le système immunitaire (Tokura et Tamura, 2007).

II. Généralités sur le chitosane : Principal dérivé de la chitine

Depuis une quinzaine d'années, un intérêt considérable a été porté aux possibilités d'utilisation pratique d'un polymère organique, aussi abondant dans la nature. C'est aussi le chitosane, dérivé déacétylé de la chitine, qui a révélé les propriétés les plus intéressantes.

II.1. Définition

Le terme chitosane, loin de répondre à une seule et unique structure chimique bien définie, s'adresse à toute une famille de copolymères linéaires à arrangement aléatoire d'unités N- acétyle -D - glucosamine et de D - glucosamine en proportions variables (Figure 4) et reliées entre elles par des liaisons β (1-4) qui confèrent au chitosane de bonnes caractéristiques filmogènes (Creuzet et al., 2006).

Ce biopolymère, naturel et non toxique, est largement produit commercialement à partir des déchets des carapaces de crabes et de crevettes (No et al., 2000).

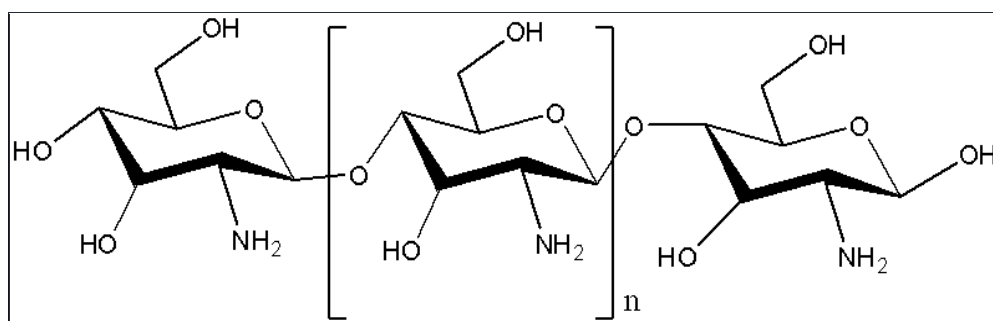


Figure 04 : structure moléculaire du chitosane (Wang et Uchiyama, 2013)

II.2. source et origine

Le chitosane est une substance peu répandue dans la nature. Il n'est présent que dans la paroi d'une classe particulière de champignons, les zygomycètes et chez quelques insectes. Il n'existe pas de source primaire de chitosane exploitable, la production est issue par la transformation de déchets de la pêche. La source majeure du chitosane commercialisé provient, en effet de la désacétylation de la chitine (Crini et al ,2009).

II.3. Le chitosane en quelques chiffres

La chitine produite commercialement représente une production encore faible comparée à la cellulose, dont les produits sont manufacturés à l'échelle de 100-200 millions de tonnes par an, comparé à moins de 10 000 tonnes pour la chitine (Varum et Simdsrod, 2004). Cependant, il est estimé que la demande de chitine et chitosane a augmenté remarquablement ces dernières années. Le chitosane a visiblement un grand potentiel dans le secteur biomédical.

II.4. Production mondiale du chitosane

L'Inde est le premier producteur mondial de chitine et de chitosane. Certains auteurs estiment que la production annuelle globale de chitosane varie actuellement entre 3000-10000 tonnes (Varum et Simdsrod, 2004). En effet, environ 1% des déchets de crustacés produits dans les pays asiatiques sont utilisés pour la fabrication de la chitine et du chitosane (Peter, 2005 *in* Rivas Araiza, 2010).

II.5. Propriétés biologiques du chitosane

II.5.1. Biocompatibilité

L'innocuité du chitosane a été démontrée chez la souris, le rat et l'homme pour une utilisation en tant qu'additif alimentaire et dans la formulation cosmétique.

II.5.2. Biodégradabilité

La biodégradabilité d'un matériau joue un rôle important dans les performances à long terme du dispositif. Le chitosane est dégradé par le milieu vivant, principalement par des phénomènes d'hydrolyse enzymatiques et non enzymatiques. Les lysozymes sont les principaux responsables de la dégradation enzymatique du chitosane, en agissant sur les portions plus acétylées (Hirano et al., 1989 *in* Dupasquier,2011). La vitesse de dégradation du chitosane est fonction du DA qui joue également sur la cristallinité des formes physiques solides et hydrogels. Ainsi le chitosane de faible DA connaît une vitesse de dégradation la plus lente *in vivo* (pouvant atteindre plusieurs mois) tandis que le chitosane de DA élevé est dégradé rapidement (Paradossi et al., 1992, Kamiyama et al., 1999 *in* Dupasquier,2011).

II.5.3. Propriétés bactériologiques et fongistatiques

L'une des propriétés conférant au chitosane un grand intérêt pour les applications médicales et agro-alimentaires est son activité antibactérienne et antifongique vis-à-vis d'un large spectre de bactéries et de champignons.

Tableau 04 : Taux d'inhibition de quelques souches fongiques en fonction de la concentration du chitosane (Laflamme et al., 1999)

Souches fongiques	Chitosane à 0.5 g/l	Chitosane à 1 g/l	Chitosane à 2 g/l
<i>Cylindrocladium floridanum</i>	20	41	56
<i>Cylindrocarpun destructans</i>	23	43	71
<i>Fusarium oxysporum</i>	25	53	55

Concernant le mécanisme d'action du chitosane, une hypothèse est que la nature cationique du chitosane interagit avec les résidus chargés négativement qui sont présents à la surface de la membrane externe des bactéries (Young et al., 1982 *in* Dupasquier,2011) ; ceci conduit à une perméabilité de la paroi cellulaire bactérienne et donc à une fuite des composants intracellulaires.

III. Propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane

III.1. Le Degré de Désacétylation (DD) ou Degré d'acétylation (DA)

En dépit de leur désignation chimique spécifique, les noms chitine et chitosane correspondent actuellement à la même famille de polymères. Ils varient seulement sur le contenant en groupe acétylé qui est désigné par le degré d'acétylation. Le degré d'acétylation présente le taux de groupe acétylé par rapport au groupe non acétylé :

$$DA = 100\% - D\% \text{ N-désacétylation} \dots\dots\dots (1)$$

Où :

DA : Degré d'acétylation

DD : Degré de désacétylation

Une chitine parfaite posséderait un degré d'acétylation (DA) de 100 % tandis que le chitosane, son dérivé désacétylé idéal, aurait un DA de 0 % (ou un degré de désacétylation, DD, de 100 %) si la désacétylation était complète. Dans la nature, ces deux extrêmes n'existent pas, la forme la plus courante est une chitine de DA de 85-95 %, rarement moins. Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine. La limite de DA entre chitine et chitosane varie selon les auteurs. On parle de chitosane à partir de 50 % de NacGlu selon Al Sagheer (2009), plus généralement le chitosane est défini comme étant la forme désacétylée à plus de 60-70 % (Le Roux, 2012).

III.2. La viscosité

La viscosité du chitosane dépend de son degré d'acétylation. En effet, plus il est désacétylé, il y a des groupements amines libres, par conséquent, sa viscosité est plus importante (Wang et Xu, 1994).

Celle-ci dépend également : de la concentration du polymère (elle augmente avec la concentration), de la température (elle chute lorsque la température augmente) (Chen et Tsaih, 1998 *in* Keddou Addar, 2008), du poids moléculaire (la viscosité intrinsèque augmente en fonction de l'augmentation du poids moléculaire) et enfin du pH (plus il est bas plus la viscosité est élevée).

III.3. La structure cristalline

III.3.1. La structure cristalline de la chitine

A l'état naturel, la chitine présente une structure fibreuse rigide. Cette propriété induit une insolubilité dans la plupart des solvants.

Ce polymère existe sous trois formes polymorphiques selon la source : la chitine α , la chitine β et la chitine γ , qui diffèrent quant à l'arrangement des chaînes dans les régions cristallines, et qui impliquent différents réseaux de liaisons d'hydrogène (Duarte, et al., 2002).

Différents arrangements des chaînes de la chitine sont possibles. Ces chaînes, sous forme d'hélice, sont toutes dirigées suivant le même axe et donnent lieu à trois allomorphes distincts (Desbrières, 2002) :

• La chitine α

C'est la plus stable et la plus abondante des trois formes. Elle existe principalement dans les exosquelettes des arthropodes (crevettes, crabes par exemple). Ses chaînes macromoléculaires s'arrangent de manière antiparallèle et cristallisent en absence d'eau dans un système orthorhombique contenant deux molécules.

• La chitine β

Elle se trouve essentiellement dans certaines diatomées marines et certains céphalopodes (exemple la plume de calamar). Les chaînes macromoléculaires s'arrangent de manière parallèle dans une maille monoclinique ne contenant qu'une seule molécule. On note la présence d'eau dans le réseau cristallin.

• La chitine γ

Plusieurs théories sont proposées à son égard. Toutefois, il semblerait que sa structure soit constituée de deux chaînes parallèles pour une chaîne antiparallèle.

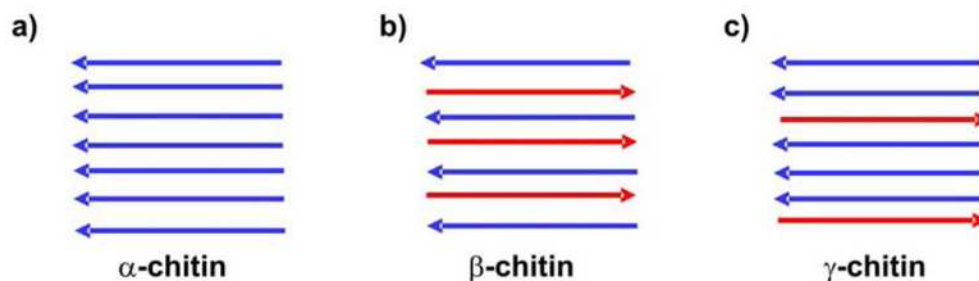


Figure 05 : Arrangement des trois formes existantes de chitine : α , β et γ (Kumirska et al., 2011).

La distinction entre ces formes peut être réalisée par RMN, Rayons X ou spectrophotométrie IR (Sun et al. 2006 *in* Le Roux, 2012).

III.3.2. La structure cristalline du chitosane

Le chitosane est une substance semi cristalline. Il cristallise dans le système orthorhombique et deux types de produits sont connus :

Le chitosane I (faible DD, sous forme de sel) est plus désordonné que le chitosane II (fort DD, forme amine libre) (Mukherjee, 2001 *in* Crini et al., 2009).

Le système orthorhombique possède trois angles α , β , γ , égaux à $\pi/2$ (90°). Les paramètres (longueurs d'arête) sont : $a \neq b \neq c$. La maille orthorhombique est un parallélépipède trirectangle.

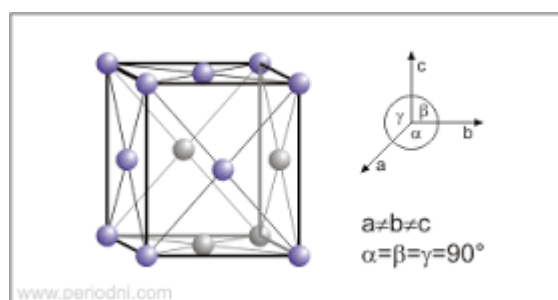


Figure 06 : Système orthorhombique

III.4. La solubilité

La solubilité d'un polymère est liée aux interactions intra et inter moléculaires entre les chaînes (Ravindra et al. 1998 *in* Le Roux, 2012). La densité de charge de la chitine implique son caractère hydrophobe. Par conséquent, elle n'est pas soluble dans les solvants classiques, ce qui limite son utilisation et sa valorisation. En effet, elle n'est soluble que dans le 2-hexafluoropropanol et dans des mélanges tels que le diméthylacétamide /chlorure de lithium, le diméthylformamide /chlorure de lithium ou l'acide dichloroacétique /dichloroéthane (Rinaudo et al, 1993).

Contrairement à la chitine qui est insoluble dans les solvants aqueux, le chitosane est soluble dans les acides faiblement dilués (comme l'acide acétique, lactique, citrique...) à des pH <6 formant des sels (Kassai, 2007). La bibliographie a montré que la solution aqueuse de l'acide acétique est le solvant le plus appropriée pour solubiliser le chitosane.

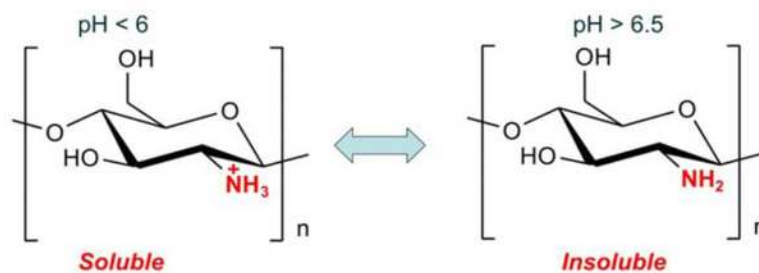


Figure 07 : illustration schématique de la polyvalence du chitosane (Kumirska et al., 2011)

III.5. La masse molaire

Le chitosane est un polymère qui peut atteindre des poids moléculaires (PM) élevés, atteignant jusqu'à 1-3 MDa dans le cas des produits obtenus par des processus contrôlés d'extraction et de désacétylation. Dans le cas du chitosane commercial pour des applications dans le domaine du traitement des eaux, le poids moléculaire est généralement plus faible (compris entre 100 et 500 KDa) (Schatz et al., 2003 *in* Crini et Badot, 2007)

IV. La production de chitine et de ses dérivés

La chitine et le chitosane sont principalement caractérisés par leur degré de polymérisation (DP), c'est-à-dire par le nombre d'unités constituant la chaîne du polymère et par leur degré d'acétylation (DA) à savoir ; le pourcentage d'unités acétylées. Ces paramètres modulent, par exemple, la densité de charge du polymère et donc sa solubilité et ses bio-fonctionnalités.

D'autres caractéristiques sont parfois mesurées en raison de leur influence sur les propriétés du polymère, tels que l'indice de cristallinité et la poly-dispersion des unités de Glu et NacGlu. Les applications de la chitine et de ses dérivés sont liées à leurs propriétés et par conséquent à ces caractéristiques (Kasaai, 2009).

IV.1. Les dérivés de la chitine

Les principaux dérivés de la chitine et leurs mécanismes de production sont schématisés par la figure 08. Par désacétylation, la chitine est convertie en chitosane, tandis que la dépolymérisation réduit la chitine en oligomères. Si le procédé est mené à son terme, le polymère est converti en résidus de Glu ou NacGlu. La dépolymérisation appliquée au chitosane produit des oligomères de chitosane puis des unités de glucosamine (Voir : Quelques dérivés chimiques du chitosane – Annexe 01).

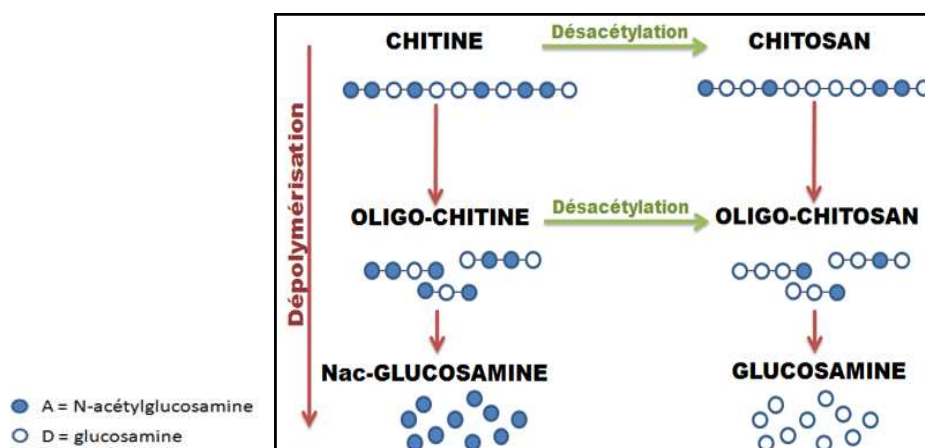


Figure 08 : Chitine et dérivés de la chitine (Le Roux, 2012)

IV.2. Méthodes de production de la chitine et du chitosane

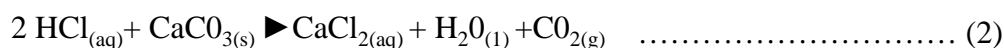
IV.2.1. Purification de la chitine

Les principales sources commerciales de la chitine sont les carapaces de crustacés comme les crabes et les crevettes où la chitine se trouve associée à des protéines, à des pigments ainsi qu'à une phase minérale composée de carbonate de calcium (CaCO_3) et de phosphate de calcium ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (Roberts, 1997 *in* Rivas Araiza, 2010).

L'élimination de ces substances est une étape nécessaire pour obtenir un produit pure et permettre ainsi l'accessibilité au polymère pour la N-désacétylation de la chitine. La méthode d'extraction de la chitine la plus utilisée est basée sur un procédé chimique acido-basique en trois étapes :

➤ Déminéralisation :

La déminéralisation est généralement réalisée par un traitement acide sous agitation, afin de transformer les minéraux non solubles de la carapace en sels solubles. Le carbonate de calcium, principal composé minéral de la carapace, réagit avec le HCl pour former du chlorure de calcium, de l'eau et du gaz carbonique comme décrit dans la réaction suivante :



Les acides utilisés sont essentiellement HNO_3 , H_2SO_4 , CH_3COOH , HCOOH et HCl à des concentrations de 1 à 10 M. Pour des raisons économiques, ce dernier est le plus fréquemment employé. La réaction se déroule à température ambiante et la durée du traitement acide est variable (de 1 à 48 h) (Desbrières, 2002).

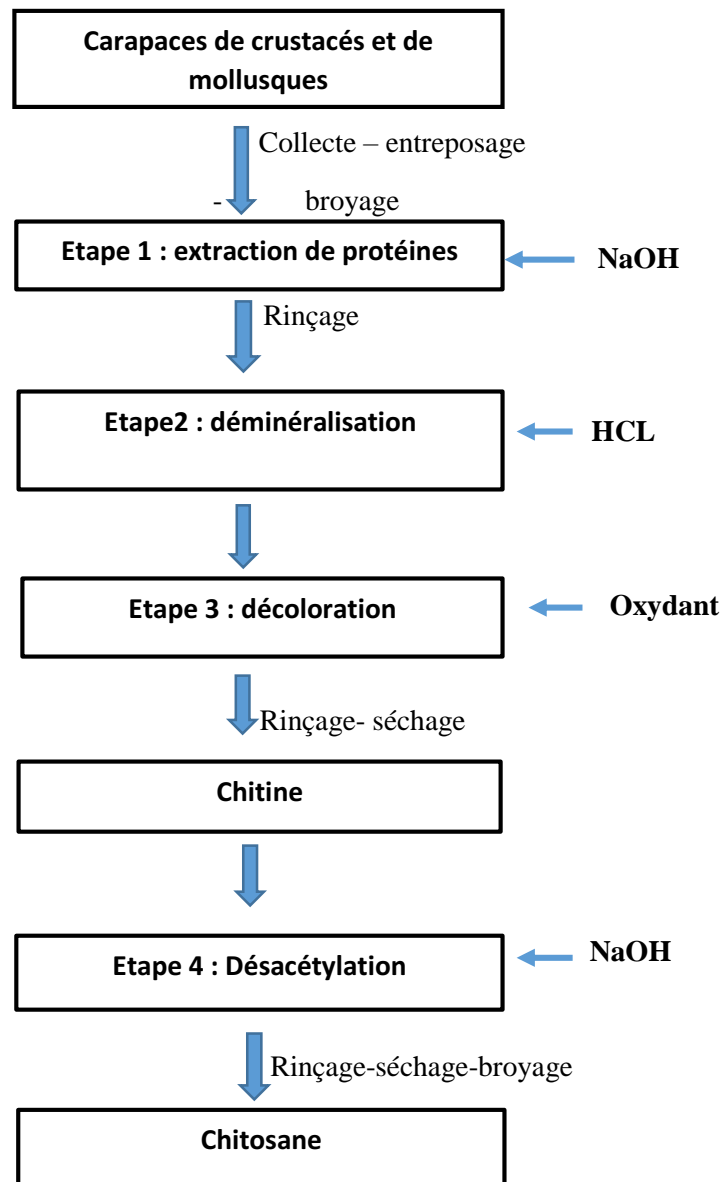
➤ **Déprotéinisation :**

A l'état naturel, la chitine se présente en association avec les protéines (Chitinoprotéines). Les protéines sont éliminées par un traitement basique. Les solutions alcalines utilisées sont à base par exemple de NaHCO_3 , KOH , Na_2SO_3 ou de NaOH qui est d'ailleurs la plus employée. La température et la durée de ces traitements alcalins sont variables ainsi que la concentration du milieu basique utilisé. L'intervalle de température est compris entre 25 et 100 °C, la durée entre 0,5 et 72 h et la concentration de l'entité basique entre 0,1 et 5 M (Tolaimate et al., 2003).

➤ A la fin de ces deux traitements, une étape dite de blanchiment peut s'avérer indispensable dans le cas où subsisterai des traces de pigments incomplètement éliminés, comme les caroténoïdes. Généralement, l'agent de blanchiment employé est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), dont la concentration est comprise entre 0,1 et 33 %, il peut également être mélangé avec du HCl . La durée du traitement est souvent très courte, de l'ordre de quelques minutes (Tolaimate et al. 2003).

Le traitement chimique modifie le poids moléculaire et le degré d'acétylation de la structure originelle de la chitine, il détruit également la structure des protéines (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003). Pour réduire le risque d'altération du polymère lié à la déminéralisation et la déprotéinisation, il est préconisé de répéter plusieurs fois l'opération pendant une courte durée et d'intercaler des phases de rinçage à l'eau distillée (Tolaimate et al. 2003) (Voir : Production chimique de la chitine selon Tolaimate et al – Annexe 01).

D'après Arguelles-Monal et al. (2000) 420 l d'eau par kilogramme de chitine sont consommés au cours de l'extraction chimique (Le Roux, 2012).

Figure 09 : Procédé de fabrication de la chitine et du chitosane (onsoyen et Skaugrud, 1990).

IV.2.2 .Méthodes d'élaboration du chitosane

Le chitosane est obtenu par traitement enzymatique ou chimique de la chitine. Il est reconnu que la méthode d'élaboration et de désacétylation déterminent les propriétés physiques, physico-chimiques et biologiques de ce polymère.

IV.2.2.1. Traitement enzymatique

La désacétylation de la chitine peut être réalisée à l'aide d'enzymes appelées *chitine-désacétylase*, avec de bons rendements. Cependant, cette méthode est limitée à l'échelle du laboratoire en raison du coût élevé des enzymes.

De ce fait, la transformation de la chitine en chitosane par désacétylation chimique s'est imposée jusqu'à aujourd'hui dans l'industrie grâce à son coût plus réduit et à sa mise en œuvre plus simple (Lamarque et al., 2005). Néanmoins, les méthodes enzymatiques, plus respectueuses de l'environnement, peuvent être vues comme des méthodes de production de chitosane à l'avenir.

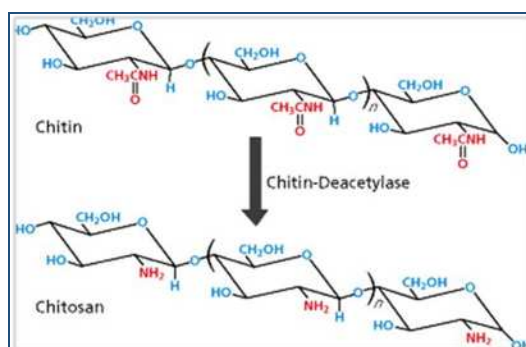


Figure 10 : Désacétylation de la chitine par traitement enzymatique

IV.2.2.2. Traitement chimique

Comme mentionné précédemment, le chitosane est produit par N-désacétylation de la chitine. La liaison amide peut s'hydrolyser en milieu acide ou basique, néanmoins les conditions d'hydrolyse en milieu basique sont plus intéressantes, car elles préservent mieux la structure du polymère en limitant l'hydrolyse (Roberts, 1997 *in* Rivas Araiza, 2010). Le groupe acétamide de la chitine est en effet relativement résistant à l'hydrolyse alcaline et sa cinétique d'hydrolyse est bien plus rapide que celle de la liaison glycosidique. Il se produit donc une dégradation (dépolymérisation) limitée, qui dépend du traitement alcalin nécessaire pour la désacétylation (Varum et Simdsrod, 2004).

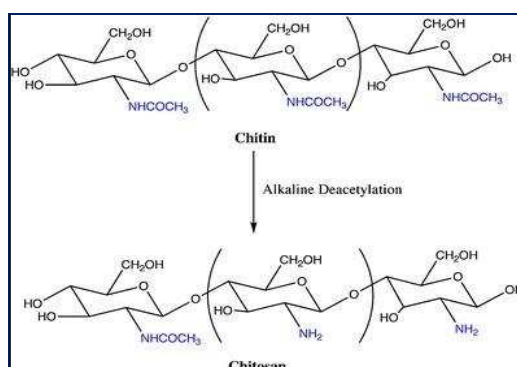


Figure 11 : Désacétylation de la chitine par traitement chimique (Coelho et al., 2010)

Une multitude de méthodes de désacétylation de la chitine sont citées dans la littérature sans qu'il n'existe de procédé standard pour la préparation du chitosane. Cependant, la plupart des méthodes utilisent des solutions aqueuses alcalines ; le plus souvent des solutions aqueuses de NaOH (35 à 50 % en masse) pour réaliser cette opération. La réaction est généralement effectuée à des températures comprises entre 80 et 140 °C et pendant une durée allant de 0,5 à 10 h. Sous de telles conditions la désacétylation, qui généralement ne dépasse pas un taux de 70 à 80 %, s'accompagne d'une rupture des liaisons glycosidiques. En procédant par étapes de courtes durées (de 0,5 à 2 h) séparées par des opérations de lavage-séchage, la désacétylation est plus efficace et la masse molaire du polymère moins affectée (Desbrières, 2002).

V. Les domaines d'applications de la chitine et de ses dérivés

La nature β (1 \rightarrow 4) des liaisons glycosidiques confère à la chitine et au chitosane des propriétés filmogènes. En outre, ces films présentent une perméabilité importante. Compte tenu de sa structure chimique, le chitosane, contrairement à la majorité des polysaccharides, présente l'avantage de posséder un caractère polycationique dû aux groupements amino qui, en solution et en milieu acide, sont chargés.

De ce fait, les molécules chargées négativement peuvent interagir avec la chaîne macromoléculaire du chitosane. C'est le cas des acides gras, des impuretés présentes dans l'eau, des protéines de la peau et du cheveu, par exemple. Ainsi, le chitosane trouve des applications importantes dans plusieurs domaines en mettant à profit ses diverses propriétés spécifiques. C'est ainsi que son utilisation dans des secteurs économiquement porteurs comme les industries alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques ou agricoles, a fait l'objet de nombreux brevets (Desbrières, 2002)

L'utilisation de chitosane dans les domaines allant de l'agriculture à la médecine en passant par l'environnement dépend de ses caractéristiques, à savoir :

- La matière première dont il est issu (Crevettes, calamar.....)
- De son degré de désacétylation : Les activités du chitosane sont significativement affectées par le degré de désacétylation (Xiaofei et al., 2015).
- De sa viscosité ou de son poids moléculaire et la longueur de sa chaîne moléculaire.
- De sa pureté qui dépend notamment de sa teneur en cendres et de protéines restantes, de la concentration en substances insolubles (turbidité).

V.1. Domaine médical et pharmaceutique

Le chitosane a une variété d'applications biomédicales prometteuses et à ce titre, il est considéré comme un matériau innovant dans les systèmes d'administration de médicaments, notamment la cicatrisation des plaies, antibactérien, liant gras, agent hémostatique, effet hypocholestérolémiant, comme indiqué par d'innombrables études publiées au cours de ces dernières années (Shakeel et Saiqa, 2016).

V.2. Domaines industriel et environnemental

Deux principales applications du chitosane sont exploitées dans le secteur agroalimentaire. En premier lieu, de par ses propriétés floculantes, il permet de séparer les particules colloïdales dispersées dans les résidus des industries de transformation. En second lieu, il est utilisé comme matrice pour l'immobilisation d'enzymes ou de cellules microbiennes, animales et végétales. Les potentiels environnementaux du chitosane ont suscité un grand nombre de recherches dans le traitement d'assainissement des eaux, dans la réduction de la turbidité et dans la stabilisation des hydrocarbures (Muzarelli, 1973 *in* Le Devedec, 2008). De plus, son utilisation pourrait permettre d'enlever diverses graisses, de réduire les matières en suspension ou encore de diminuer les charges bactériennes (Rinaudo, 2006).

Le tableau 1 présente quelques applications du chitosane dans différents domaines d'exploitation. Omniprésent dans l'industrie, sous une forme ou une autre, on le retrouve en agriculture (pour protéger les plantes), dans l'industrie cosmétique (stabilisant, régénérant cellulaire, antibactérien) ou encore l'industrie du papier (propriétés mécaniques) (Rinaudo, 2006).

Tableau 05 : Applications du chitosane (adapté de Rinaudo, 2006)

DOMAINE D'EXPLOITATION	APPLICATIONS
Potentiel biomédical	Sutures chirurgicales Implants dentaires Peaux artificielles Reconstructions osseuses
Agriculture	Mécanisme défensive Stimule la croissance des plantes Enrobage (protection) Libération de fertilisants et nutriments
Traitement des eaux	Polymère écologique Pouvoirs séquestrant (métaux lourds, colorants etc.) Diminution de la turbidité Diminution des odeurs Bactéricides
Alimentaire	Non digestible (diète aux fibres) Hypocholestérolémiant Agent de conservation Stabilisateur Antimicrobien Enrobage protecteur (fruits)
Cosmétique	Crèmes Traitement de l'acné Produits hydratants Formulation de dentifrices Formulation de shampoings
Biopharmaceutique	Immunostimulants Antitumoraux Anticoagulants Bactériostatiques Libérations contrôlées (matrices)

Section 3. Médicaments et système de libération du principe actif

Système de relargage contrôlé à base de chitosane

La chitine et le chitosane ont capté de plus en plus l'intérêt des chercheurs durant la dernière décennie, grâce à leurs propriétés intrinsèques en adéquation avec les applications médicales potentielles.

Leur biocompatibilité, la capacité de libération des composés hydrosolubles et à moduler leurs propriétés physico-chimiques permettent la génération de nouveaux biomatériaux avec des applications dans le domaine de la libération contrôlée des médicaments

À l'état natif, le chitosane se comporte comme un agent désintégrant et par conséquent, il n'est pas employé seul dans les formulations biomédicales et pharmaceutiques. *Mi et al*, (1997) ont rapporté que les comprimés à base de chitosane natif avaient peu de propriétés cohésives et leur passage en milieu de dissolution montrait une érosion en moins de 4 heures. Cependant, le mélange de chitosane avec des polymères anioniques, comme l'alginate, améliore la stabilité du support et augmente le temps de libération contrôlée au-dessus de 12 heures (Le Devedec, 2008).

Donc, mélanger des polymères de nature chimique différente, en perspective de l'élaboration de matériaux polymères originaux, est une démarche à priori très séduisant. La science des matériaux offre, en effet, maints exemples d'alliages dont les propriétés sont bien supérieures à celles des composés de départ.

De plus, élaborer un matériau original à partir d'un mélange de polymères semble, au premier abord, moins couteux et moins aléatoire que synthétiser un polymère inconnu à partir d'un nouveau monomère (Khan et al., 2000).



I. Définition d'un médicament :

Un médicament est défini d'une façon très large comme une substance chimique qui affecte les processus de la vie. L'OMS donne une définition plus restrictive : « Toute substance ou produit qui est utilisé pour modifier ou explorer les systèmes physiologiques ou les états pathologiques pour le bénéfice de celui qui reçoit la substance » (Helali, 1994 *in* Chenouf et Nafti, 2008).

I.1. Composition d'un médicament

Tout médicament est composé de deux éléments :

- > **Principe actif** : c'est la molécule active détenant les propriétés curatives ou préventives ;
- > **Excipient** : c'est une substance inactive par elle-même, dont l'intérêt est de faciliter l'utilisation du médicament, et notamment sa libération.

I.1.1. Principe actif

Ce qui confère à un médicament son activité thérapeutique, c'est **le principe actif**. La nature du principe actif peut être d'origine :

- Synthétique : le produit est caractérisé par ses constantes physiques et chimiques ;
- Biologique : obtenu à partir d'animaux, de végétaux ou de micro-organismes ;
- Minérale : obtenu à partir de produits naturels tels que les minéraux, les produits fossilisés...

I.1.2. Les excipients

Les excipients sont des composés chimiquement hétérogènes qui vont des molécules simples (eau) à des mélanges complexes d'origine naturelle, semi synthétique ou des matières plastiques (polymères).

I.1.2.1. Définition et classification

L'International Pharmaceutical Excipient Council (IPEC) définit un excipient comme toute substance, autre que la substance active, qui rentre dans le procédé industriel ou qui est contenue dans la forme pharmaceutique finale. Un excipient peut avoir de multiples effets, il peut être un liant, un désintégrant, un diluant, un lubrifiant, un émulsifiant, un agent solubilisant ou un conservateur antimicrobien. En plus de l'activité recherchée, l'excipient idéal doit être chimiquement stable, non réactif vis-à-vis de la substance active et des autres excipients, inerte vis-à-vis du corps humain et enfin bien caractérisé pour être accepté par l'industrie et les instances de régulation. D'autre part, puisque la meilleure formulation est celle la plus simple, un excipient multifonctionnel sera d'autant plus apprécié (Langer, 1999 *in* Khaber Azi, 2011).

I.1.2.2. Rôle des excipients

Les excipients sont des substances associées étroitement aux principes actifs des médicaments. Dans la préparation pharmaceutique, leur rôle est de :

- Donner lieu à une forme pharmaceutique, faciliter l'administration et pouvoir stabiliser le PA (conservation) ;
- Pouvoir solubiliser le principe actif ;
- Permettre une solubilisation correcte et ciblée (dans l'estomac ou dans le tube digestif) ;
- Donner au principe actif une sapidité nécessaire en masquant le goût et le protéger contre l'acide gastrique ;
- Garantir la préservation antimicrobienne ;
- Permettre d'accélérer ou de ralentir la résorption du PA ;
- Améliorer l'efficacité du principe actif : le cas d'une forme à libération prolongée (Goole, 2008).

➤ I.1.2.3. Choix des excipients

La qualité d'un médicament ne dépend pas uniquement des propriétés physicochimiques du principe actif, mais aussi des excipients qui lui sont associés. Leur choix est crucial.

D'une manière générale, les propriétés essentielles requises pour un matériau de conditionnement sont les suivants :

- Posséder une résistance physique suffisante tout en étant léger et aussi peu encombrant que possible ;
- Être imperméable aux constituants du médicament ;
- Isoler le médicament des facteurs extérieurs qui pourraient altérer sa conservation ;
- Être inerte vis-à-vis du contenu : les échanges entre contenu et contenant doivent être aussi faibles que possible ;
- Être, qualité primordiale, d'une innocuité absolue (Le Hir et al., 2009).

I.1.2.3.1. Le chitosane comme excipient

Au début des années 80, une étude menée par Sawaya-nagi et al a montré que le chitosane possédait des propriétés intéressantes comme matériau compressible sous forme de tablettes dans lesquelles on pouvait incorporer des composés hydrosolubles (Crini et al., 2009).

Ces tablettes se désintégraient rapidement et pouvaient ainsi relâcher les composés incorporés. Ces travaux originaux ont servi de point de départ pour l'utilisation du chitosane, de chitosanes modifiés chimiquement, de formulations de mélanges chitosane/chitine et chitosane/polymères anioniques et autres, ainsi que de chitosanes réticulés comme outil de relargage contrôlé de médicaments de manière systémique ou ciblée (Shyu et al., 2005 in Crini et al., 2009).

I.1.2.3.2. La diatomite comme excipient

La terre de diatomées est largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique, comme un ingrédient actif contenant du silicium ou un excipient dans les formulations pharmaceutiques. Un autre avantage de la diatomite est qu'elle est biologiquement inerte, elle interagit rarement avec le corps humain et même si l'interaction a lieu, elle est bénéfique pour l'organisme. La terre de diatomées n'est pas absorbée dans le corps et elle est excrétée sous forme inchangée. Elle est chimiquement neutre, biologiquement inerte, non allergène, durable, peu coûteuse, persistante et stable.

➤ Origine des diatomites

Les Diatomites (terres à diatomées, terres siliceuses ou Kieselguhrs) sont des carapaces des diatomées fossiles déposées il y a quelques millions d'années (Hamdi, 1998). Les Diatomées sont des plantes aquatiques microscopiques unicellulaires, appartenant à la famille des algues (Ulmann's). Ces algues pullulent dans les lacs et certains fonds marins. Au fur et à mesure que la substance végétale de l'algue se décompose, les carapaces siliceuses s'accumulent au cours des âges et constituent des gisements. Il existe près de 10.000 espèces de Diatomites formant de vastes dépôts de sédimentation dans divers parties du globe terrestre (Iler, 1979).

➤ Généralités sur les Diatomées

Les diatomées sont des micro algues brunes unicellulaires pourvues d'un exosquelette en silice appelé le frustule. Composé d'opale $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, ce squelette est propice à leur fossilisation (Voir : Origine de la silice dans les diatomées – Annexe 02). Elles sont présentes dans tous les milieux aquatiques où elles adoptent différents modes de vies. Leur spectre de taille varie de 10 à 200 μm (Seckbach & Kociolek, 2011) (Voir : Structure des diatomées – Annexe 02). L'homme a su trouver dans les diatomées de nombreuses utilisations allant de la conchyliculture à la production d'antibiotiques.

Par microscopie, on distingue deux formes usuelles de diatomées (Erhat, 1973) :

- les diatomées **centriques** à ornementation rayonnante ou Concentrique (Figure10),
- les diatomées **pennées** à ornementation bilatérale (Figure 11).
-



Figure 12 : Diatomées centriques (Erhat, 1973)

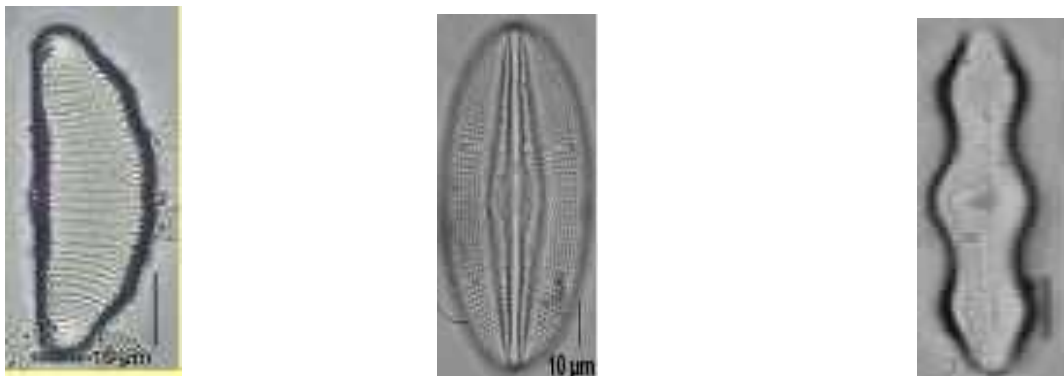


Figure 13 : Diatomées pennées (Erhat, 1973)

I.1.2.3.3.L'agar comme excipient

L'agar est un mélange de polymères riches en galactose et 3,6- anhydrogalactose. Il est extrait de certaines algues rouges (Rhodophyceae) appartenant surtout au genre *Gelidium* et *Gracilaria*. L'agar ou gélose joue un rôle très important en agroalimentaire et il est utilisé en pharmacie comme gélifiant et émulsifiant (Gazengel et Orecchioni,2013).

I.4. Interactions principes actifs /excipients

Les excipients font, par définition, partie intégrante du médicament et peuvent influencer très largement son mode d'action (Langer, 1999 in Khaber Azi, 2011).

II. Relargage de principes actifs pharmaceutiques

II.1.Libération du principe actif

Lors de l'administration d'une forme pharmaceutique solide (dragés, gélules, comprimés, cristaux) la première étape de la mise à disposition du principe actif est la libération. Elle intervient par désintégration de la forme solide suivie d'une désagrégation en particules de petites tailles. Elle aboutit à une dispersion fine du principe actif à l'état solide dans le milieu aqueux du site d'administration (Ferry, 2000).

Les facteurs influant la cinétique de libération du ou des principes actifs à partir de la forme galénique solide sont complexes et dépendent d'une part, de la nature physicochimique des principes actifs (en particulier leur forme cristalline) mais aussi des excipients (Ludden, 1991 *in* Khaber Azi, 2011).

II.2.Dissolution du principe actif

Pour traverser les membranes biologiques ou être absorbé, le principe actif doit être dispersé à l'état moléculaire en milieu aqueux, au site d'absorption. C'est l'étape de dissolution. La vitesse de dissolution du principe actif est fonction de ces caractéristiques physicochimiques et du pH du milieu d'absorption. La dissolution du médicament se fait plus ou moins rapidement selon l'hydrosolubilité des médicaments et la forme galénique (Le Hir, 2001).

Les vitesses de libération et de dissolution du principe actif sont des caractéristiques essentielles de la forme galénique, elles déterminent sa vitesse d'absorption (Ferry, 2000).

II.3.Absorption du principe actif

L'absorption est un phénomène qui correspond au transfert du médicament dans la circulation générale à partir de son site d'administration. Le PA dissous traverse les membranes biologiques pour pénétrer dans la circulation sanguine.

I. Matériel utilisé :

I.1. Petit matériel

- Verrerie de laboratoire : fioles jaugées, entonnoirs, béchers, pipettes, tubes à essai, éprouvettes
- Micropipette
- Pincés
- Spatule
- Seringue
- Tamis de type AFNOR (160 μ m).

I.2. Appareillage

- Le spectrophotomètre d'absorption UV visible, de marque Shimadzu
- Le spectrophotomètre infrarouge FTIR – 8400 de marque
- Balance de précision, de marque Denver Instrument
- Agitateur à plaque chauffante, de marque techno Kartell
- pH mètre, de marque HANNA instrument (Type : pH 208)
- Bain thermostat, de marque memmert
- Autoclave, de marque SANO clav
- Four à moufle, de marque WiseTherm
- Lyophilisateur
- Thermomètre
- Etuve
- Mixeur, de marque SEB

I.3. Matériaux

- Les carapaces de crevettes sont fournies par le restaurant – LE QG – STEAK HOUSE – qui se situe au Val d'Hydra (Wilaya d'Alger)
- chitosane commercial : produit Sigma - Aldrich avec les caractéristiques suivantes :
 - Apparence : poudre de couleur beige ;
 - Degré de désacétylation : 75 à 85 %
- L'agar-agar, produit commercial de la société Merck
- Diatomite issue du gisement de Sig, dans l'ouest d'Algérie.
- Tétracycline : solubilité 95%

I.4. Produits chimiques

- L'hydroxyde de sodium NaOH
 - Utilisé pour la déprotéinisation de la matière première et pour la désacétylation de la chitine
 - Produit FLUKA de masse moléculaire M=40.00 g/mol.
 - Aspect : pastilles blanches
- L'acide acétique CH₃COOH

- Utilisé pour dissoudre le chitosane.
- Produit Prolabo de pureté 99-100 %
- L'acide chlorhydrique HCL
 - Utilisé pour la déminéralisation de la matière première
- Peroxyde d'hydrogène H₂O₂
- Chlorure de calcium CaCl₂

PARTIE EXPERIMENTALE

Comme annoncé au début de ce travail, notre intérêt est axé sur la conception d'un biopolymère chitineux afin d'envisager son application dans le domaine médical et pharmacologique.

Pour nos expériences dans ce travail, nous avons d'abord procédé à l'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevettes en suivant deux étapes principales : élimination des protéines et élimination des sels minéraux. Ensuite, nous sommes passés à la désacétylation de la chitine par un traitement alcalin afin d'obtenir le chitosane.

Dans une deuxième étape, nous avons procédé à la préparation d'un complexe médicamenteux à base de différents excipients dont le chitosane, puis nous avons suivi la libération du principe actif qui est la tétracycline afin de confirmer l'intérêt des excipients dans la formulation d'un médicament.

II. Extraction de la chitine de la carapace de crevettes et production du chitosane

II.1. Identification et préparation de la matière première

II.1.1. Source des carapaces

La matière première utilisée pour cette étude est l'exosquelette de crevette blanche *Parapenaeus longirostris*, très abondante sur nos côtes (Algérie).



Figure 13 : Crevette blanche : *parapenaeus longirostris*

II.1.2. Prétraitement des carapaces

Les carapaces ainsi récupérées sont emmenés en laboratoire, elles sont ensuite lavées puis séchées à l'aide d'un lyophilisateur. L'étape suivante consiste à broyer ces dernières au Blender. Les fragments obtenus sont triés sur tamis afin de séparer trois tailles.

II.1.3. Lyophilisation

La lyophilisation est reconnue comme étant la méthode de séchage la plus efficace au monde, car elle permet d'éliminer, par procédé physique appelé sublimation, presque la totalité de l'eau (sauf l'eau intracellulaire) contenue dans le biote sans modifier ses caractéristiques physico-chimiques. Une fois la cloche posée, une pompe sous vide va aspirer la totalité de l'air et de ce fait un vide très puissant va se créer, transformant ainsi la glace contenue dans les carapaces en une forme gazeuse.

Les carapaces de crevette préalablement congelées sont immédiatement placées dans les étages du lyophilisateur à -56°C et sous vide (10^{-1} bar) pendant 48heures.



Figure 14 : Lyophilisateur

II.1.4. Broyage

Après avoir récupéré soigneusement les carapaces sèches du lyophilisateur, l'étape suivante consiste à les broyer au Blender. La vitesse et le temps ont été contrôlés lors de l'opération afin d'obtenir une fine granulométrie.



Figure 15 : Broyage des carapaces de crevettes au Blender

II.1.5. Tamisage

Le tamisage est un procédé qui permet d'avoir des échantillons séparés à différentes fractions granulométriques. Les fragments obtenus sont triés sur tamis afin de séparer trois tailles : inférieur à 1mm, compris entre 1 et 2.5 mm et supérieur à 2.5 mm.



Figure 16 : Fragments obtenus après tamisage

II.1.6. Caractérisation des poudres de carapaces

II.1.6.1. Matière sèche

Pour estimer la part d'eau dans un produit, 1 à 2 g d'échantillon sont prélevés et pesés dans une coupelle de poids connu. La coupelle est placée 24 h dans une étuve à 105 °C, puis pesée après 30 min de refroidissement. L'expérience est réalisée en triplicata.

La teneur en humidité est évaluée selon la formule suivante :

$$\% \text{ Humidité} = ((M_o - M) / M_o) * 100 \dots\dots\dots (3)$$

M_o : masse de carapace humide

M : masse de carapace sèche

II.1.6.2. Teneur en cendres

La teneur en cendres est déterminée en calcinant en triplicata 2g d'échantillon séché pendant huit heures à 500°C°. Chaque échantillon est placé dans un creuset en porcelaine préalablement pesé. Les échantillons calcinés sont refroidis dans un dessiccateur pendant 1 heure de temps avant d'être pesés.

La teneur en cendres est évaluée selon la formule suivante :

$$\% \text{ Cendres} = (P \text{ calciné} / P \text{ sec}) * 100 \dots\dots\dots (4)$$

$P \text{ calciné}$: Poids de l'échantillon calciné (g).

$P \text{ sec}$: Poids de l'échantillon sec (g).

II.2. Production de la chitine et du chitosane

II.2.1. Extraction chimique de la chitine

Selon le principe décrit par la section II du chapitre 1, l'extraction chimique consiste en une déminéralisation acide et une déprotéinisation basique. Le protocole adopté est inspiré de l'étude de Tolaimate et al. (2003).

- 3 g environ de poudre de carapaces broyées sont prélevés et mélangés avec 30 ml de HCl 1 M dans un tube. Il est placé sous agitation 1 h à Tamb. Pendant cette étape, le CO₂ est éliminé sous forme gazeuse, c'est pourquoi le tube doit être ouvert.
- Le contenu du tube est ensuite filtré sur toile filtrante et rincé abondamment à l'eau distillée.

- Le filtrat est introduit dans un flacon en Pirex, dans lequel sont ajoutés 30 ml de NaOH 1,25 M. La déprotéinisation dure 2 h dans un bain marie à 90 °C.
- Le contenu du flacon est à nouveau filtré sur toile filtrante et rincé abondamment à l'eau distillée.
- Le degré de déprotéinisation peut être amélioré par une étape intermédiaire, au bout d'une heure, de filtration et rinçage. Quand l'eau de rinçage n'est plus colorée, l'eau distillée est remplacée par un volume de 20 ml de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pour blanchir le produit.
- Le filtrat est alors transféré dans une coupelle préalablement pesée qui est placée en étuve à 90 °C pendant une nuit

Tableau 06 : Etapes de l'extraction chimique de la chitine







<p>Etape 1 : Déminéralisation 3g mélangés avec 30ml de HCL 1M avec agitation pendant 1heure</p>	
<p>Etape 2 : Filtration du contenu et rinçage à l'eau distillée</p>	
<p>Etape3 : Déprotéinisation Mélange du retentât avec 30ml de NaOH 1.25M durant 2h dans un bain marie à 90 C°</p>	
<p>Etape 4 : Filtration du contenu et rinçage à l'eau distillée</p>	
<p>Etape 5 : Blanchiment Rinçage du retentât avec du peroxyde d'hydrogène</p>	
<p>Etape6 : Le filtrat est placé en étuve à 90C° pendant une nuit</p>	



Figure 17 : Chitine produite en laboratoire

II.2.2. Production du chitosane par méthode chimique

En partant de la chitine, une opération de désacétylation conduit à l'obtention de la molécule du chitosane avec un degré de désacétylation (DD) qui est fonction du protocole suivi et des conditions de production.

Si l'extraction de la chitine est aujourd'hui facilement réalisable, l'étape la plus délicate reste la désacétylation qui nécessite de substituer suffisamment les groupements acétyles pour aboutir au chitosane, ce qui peut entraîner une réduction excessive de longueur de chaîne du polymère (Xiafoei et al., 2015). En jouant sur la durée du traitement alcalin et sur l'élévation de température, il est donc possible d'obtenir différents chitosanes à partir d'une même chitine.

La désacétylation est généralement effectuée par le traitement avec la soude ou la potasse concentrée (35-50 %) à une température comprise entre 80 et 140 °C, pendant au moins 30 minutes pour enlever certains ou tous les groupements acétyle de la chitine (Desbrières, 2002).

La transformation de la chitine obtenue en chitosane s'est faite à l'aide de l'autoclave. Ce dispositif permet d'avoir de fortes températures et pressions.

II.2.2.1. Production du chitosane par autoclave

Environ 5g de chitine sont prélevés et mélangés dans une solution de soude (NaOH) d'une concentration de 40%. Le rapport poids/volume (p/v) est toujours le même : 1/10.

L'échantillon ainsi préparé est mis dans l'autoclave (SANO Clav : pression maximale : 4bars/Température maximale : 120C°) à une pression de 0.4 bar et une température égale à 100C° pour une durée de 3heures.

A la fin de cette étape, le chitosane ainsi produit est lavé avec plusieurs bains avec de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un pH neutre. Le pH du filtrat a été contrôlé à l'aide d'un pH mètre de paillasse.

La poudre de chitosane est placée en étuve à 70C° pendant 24 heures.



Figure 18 : Production du chitosane par autoclave



Figure 19 : Chitosane produit en laboratoire

II.3.Caractérisation qualitative des produits

II.3.1.Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier – FTIR

La spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (FTIR) permet d'identifier la présence de groupements chimiques spécifiques. Les liaisons entre atomes vibrent selon une fréquence spécifique qui dépend de la masse des atomes engagés et de la rigidité relative de la liaison. Ces liaisons absorbent des ondes infrarouges d'énergie spécifique selon la fréquence de leur vibration.

L'analyse spectroscopique infrarouge permet d'identifier les plages de fréquence d'absorption des infrarouges d'un échantillon et de déterminer par la suite les groupes chimiques conséquents (Marquis-Duval, 2008).

Le mode opératoire consiste généralement à broyer 1 mg d'échantillon avec 100 mg de KBr (Fluka). Le mélange est compacté sous presse afin de former une pastille. Celle-ci est placée dans le spectromètre, sous le faisceau de rayons infrarouges.

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR de type SHIMADZU dans la plage de 400 à 4000 cm^{-1} sur des pastilles KBr contenant de la chitine et du chitosane.

II.3.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Le microscope électronique à balayage nous permet d'observer essentiellement la morphologie des grains (poudre ou massif) mais aussi des contrastes de phase ainsi que l'estimation de la composition de la surface. Ce dispositif permet d'obtenir des images de surfaces de pratiquement tous les matériaux solides, à des échelles allant de celle de la loupe (x 10) à celle du microscope électronique en transmission (x 500.000 ou plus). Ces images frappent en premier par le rendu très parlant du relief et la grande profondeur de champ (Faerber, 2004).

Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope électronique à balayage de type Quanta 400, de la firme FEI, équipé d'un détecteur de rayons X en énergie dispersive, sans azote, model OCTANE PRO, de la firme EDAX AMETEK.

III. système polymère – médicament

III.1. Préparation de la solution de chitosane

Le chitosane utilisé est issu de (SIGMA-ALDRICH, lot #STBF3507V). 4g de chitosane en poudre ont été dissout dans 100ml d'une solution d'acide acétique à 5%. La préparation est soumise à une agitation modérée pendant 6 heures afin de dissoudre la totalité du chitosane.



Figure 20 : préparation de la solution de chitosane.

A l'issue de cette opération, la solution obtenue a été filtrée sur une membrane de filtration millipore ($0.7\mu\text{m}$) pour éliminer le chitosane non dissout. La solution préparée se présente sous forme d'un gel légèrement visqueux de couleur jaunâtre.



Figure 21 : Solution de chitosane

III.2. Traitement de la diatomite

Le traitement de la diatomite consiste en une élimination du quartz et de la silice, le protocole adopté est inspiré de l'étude de Hamdi. (1998).

III.2.1. Origine de la diatomite utilisée.

La diatomite naturelle utilisée dans cette étude provient du gisement de Sig, dans l'ouest d'Algérie. Ce dernier est exploité par la filiale DIATALE de la société ENOF.

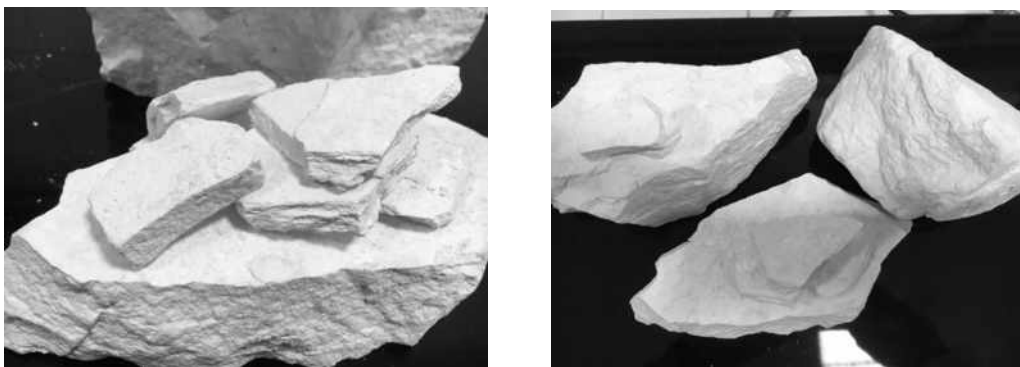


Figure 22 : Diatomite.

III.2.2. Broyage de la diatomite

La diatomite est broyée en poudre fine dans un mortier en porcelaine (Figure23).



Figure 23 : Broyage de la diatomite à l'aide d'un mortier en porcelaine.

III.2.3. Tamisage

Le tamisage est un procédé qui permet d'avoir des échantillons séparés à différentes fractions granulométriques.

La poudre obtenue par broyage est traitée à l'aide d'un tamis.



Figure 24 : Tamisage à l'aide d'un tamis en INOX.

III.2.4. Elimination de la silice Quartz

Après avoir récupéré la diatomite tamisée, il est prélevé 10 g à mettre dans 1 litre d'eau distillée dans un flacon propre à agiter fortement pendant plusieurs minutes. Laisser reposer le produit pendant 48 heures.

Après avoir laissé reposer pendant 48 heures, la première couche est enlevée (2à3mm). La couche récupérée est ainsi placée dans une coupelle et séchée à l'étuve à 105C° pendant 24 heures.



Figure 25 : Etapes d'élimination de la silice quartz de la poudre de diatomite

III.2.5. Extraction de la calcite

L'extracteur **soxhlet** est un ingénieux dispositif en verre permettant l'**extraction** d'une substance. Il est principalement utilisé dans la préparation d'échantillons avant analyse, dans la détermination de matières grasses dans les eaux, de détergents...

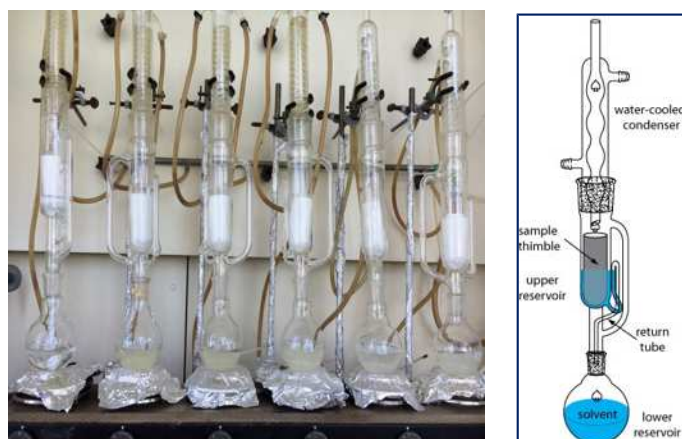


Figure 26 : Extracteur SOXHLET.

L'extraction de la calcite contenue dans l'échantillon de diatomite est réalisée à l'aide d'un extracteur Soxhlet. Cette opération permet d'extraire par lessivage la calcite contenue dans l'échantillon de diatomite avec une solution acidifiée de chlorure d'hydrogène HCL 0.5N introduite dans le ballon.

Ladite opération dure 6 heures, à l'issue de laquelle l'échantillon produit est lavé plusieurs fois à l'eau distillée jusqu'à l'élimination de l'acide et l'obtention d'un pH neutre. L'échantillon ainsi obtenu est mis au séchage pendant 24 heures à une température égale à 105°C°.



Figure 27 : extraction de la calcite contenue dans la poudre de diatomite

III.2.5. Caractéristiques physico-chimiques et chimiques de la diatomite

III.2.5.1. Teneur en humidité

La détermination de la teneur en eau s'effectue en mettant 1g d'échantillon de diatomite dans un creuset en porcelaine préalablement pesé qu'on place dans une étuve à 105°C° pendant 24 heures. Une fois les échantillons retirés de l'étuve ils sont à nouveau pesés. L'expérience est réalisée en quadruplicata.

La teneur en humidité est évaluée selon la formule suivante :

$$\% \text{ Humidité} = ((M_o - M) / M_o) * 100 \dots\dots\dots(3)$$

M_o : masse de diatomite humide

M : masse de diatomite sèche

III.2.5.2. La composition chimique

La spectrométrie de fluorescence X est une méthode d'analyse chimique utilisant une propriété physique de la matière, la fluorescence de rayons X.

Lorsque l'on bombarde de la matière avec des rayons X, la matière réémet de l'énergie sous la forme de rayons. C'est la fluorescence X.

Le spectre des rayons X émis par la matière est caractéristique de la composition de l'échantillon, en analysant ce spectre, on peut en déduire la composition élémentaire, c'est-à-dire les concentrations massiques en éléments.

III.3. Réalisation des comprimés

Il est à noter que le protocole d'élaboration du complexe médicamenteux avec ou sans diatomite nous a été proposé par B. Hamdi.

III.3.1. Préparation du composite « Tétracycline- Diatomite- Chitosane- Agar_agar »

Des quantités de diatomite, d'agar-agar et de tétracycline sont mesurées ; respectivement à ; 2g, 3g et 200mg, et dispersées dans 50 ml d'eau chaude. L'échantillon ainsi constitué est soumis à une agitation afin d'obtenir une solution homogène.

Cette solution est introduite goutte à goutte, via une seringue de 25ml, dans 100 ml de bain gelant de 0.25M CaCl₂, qui contient 2%(w/v) de chitosane de 2% d'acide acétique. Des billes sont formées. A la fin de cette étape, les billes ainsi obtenues sont d'abord séchées à température ambiante, puis transférées à l'étuve à une température égale à 40C°.



Figure 28 : Réalisation des comprimés à base de Chitosane- Diatomite - tetracycline et agar_agar

III.3.2. Préparation du composite « Tetracycline- Chitosane- Agar_agar »

Des quantités de d'agar-agar et de tétracycline sont mesurées ; respectivement à ; 3g et 200mg, et dispersées dans 50 ml d'eau chaude. L'échantillon ainsi constitué est soumis à une agitation afin d'obtenir une solution homogène.

Cette solution est introduite goutte à goutte, via une seringue de 25ml, dans 100 ml de bain gelant de 0.25M CaCl₂, qui contient 2%(w/v) de chitosane de 2% d'acide acétique. Des biles sont formées. A la fin de cette étape, les biles ainsi obtenues sont d'abord séchées à température ambiante, puis transférées à l'étuve à une température égale à 40C°.



Figure 29 : comprimés à base de Chitosane-tetracycline et agar_agar

III.4. Cinétique de libération du principe actif

III.4.1. Préparation des solutions étalons de tétracycline

Une solution mère à 500 mg/l de tétracycline est préparée dans une fiole de 500 ml. Ensuite cinq solutions filles, respectivement, à 10mg/l, 30mg/l, 50mg/l, 80mg/l et 120 mg/l sont préparées dans des fioles de 50ml.



Figure 30 : solution mère de tétracycline

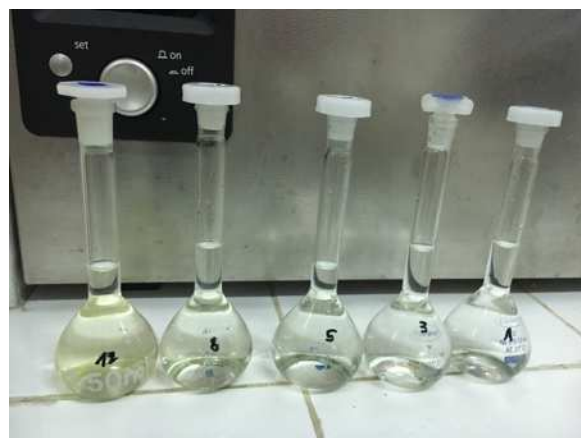


Figure 31 : Solutions filles de tétracycline

- **Contrôle de libération par UV-visible :**

La spectroscopie d'absorption UV/Vis est fondée sur le phénomène d'absorption d'énergie lumineuse par une substance et la radiation électromagnétique. Une molécule absorbe une partie de la radiation électromagnétique, cette absorption d'énergie est automatiquement accompagnée d'une transition électrique d'un niveau fondamental à un niveau d'énergie supérieure.

La spectroscopie UV/Vis permet d'obtenir le spectre des composés examinés sous la forme d'un tracé de la transmittance ou de l'absorbance en fonction des longueurs d'onde en nanomètre.

Cette technique permet le suivi de la libération des principes actifs.

L'absorbance de la solution de tétracycline à différentes concentrations a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible à 351 nm.



Figure 32 : Spectrophotomètre UV-Visible

III.4.2. Cinétique de relargage de la tétracycline

III.4.2.1. Composite Diatomite- Chitosane - Agar_agar et Tétracycline

- 1g environ du composite préparé est prélevé et mélangé avec 100 ml d'eau ultra-pure dans un Erlen Meyer de 250 ml.
- Le pH du mélange est ajusté avec du HCL jusqu'à 4 afin de reproduire les conditions du milieu gastrique.
- L'Erlen Meyer est placé sur un bain thermostat réglé préalablement à 37 C° avec une agitation.
- L'absorbance de la solution est mesurée à t_0 , puis un volume de 2ml dosé par UV-Visible est prélevé à chaque 10 mn, pour une dizaine de fois.

III.4.2.1. Composite Chitosane - Agar_agar et Tétracycline

Il est soumis au même protocole décrit ci-dessus



Figure 33 : Bain thermostaté avec agitation

Chapitre III

Résultats et Discussion

I. Échantillons de chitine et de chitosane

I.1. Composition de la matière première

I.1.1. Matière sèche

Les valeurs obtenues lors de la mesure de la teneur en eau des carapaces de crevettes sont représentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 07 : Taux d'humidité dans la matière première

	Echantillon (1)	Echantillon (2)	Echantillon (3)
Taux d'humidité (%)	11	12	12

I.1.2. Teneur en cendres

Les résultats obtenus pour le taux en cendres des échantillons de poudre sèche de carapaces de crevettes sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 08 : Taux de cendres dans la matière première

	Echantillon (1)	Echantillon (2)	Echantillon (3)
Taux de cendres (%)	26.5	27	26.5

La quantité de cendres dans les trois échantillons, déterminée par l'incinération concorde avec celle estimée par le laboratoire de Nantes (Le Roux, 2012) qui varie de 19 à 28 % avec une moyenne de 24.2 % et par Arbia, 2010 qui est de l'ordre de 27%.

I.2. Méthodes d'analyses

I.2.1. Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier – FTIR

Les analyses ont été effectuées au CRAPC de Bou Ismail à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR de type SHIMADZU dans la plage de 400 à 4000 cm^{-1} sur des pastilles KBr à 1% contenant de la chitine et du chitosane produits chimiquement en laboratoire.

I.2.1.1. La chitine extraite et la chitine standard

Les figures 35 et 36 qui suivent représentent, respectivement, le spectre IR de la chitine extraite à partir des carapaces de crevettes et le spectre IR standard de la chitine proposé par la littérature.

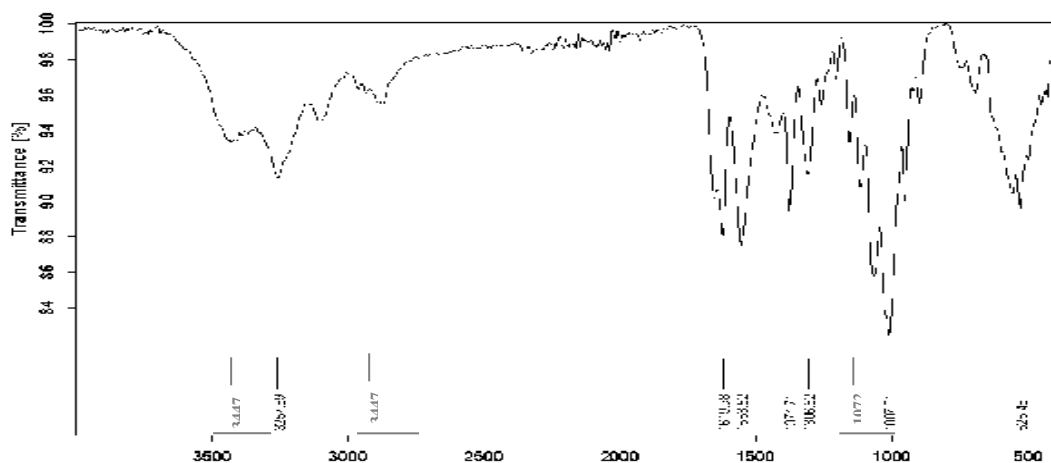


Figure 35 : Spectre IR de la chitine extraite

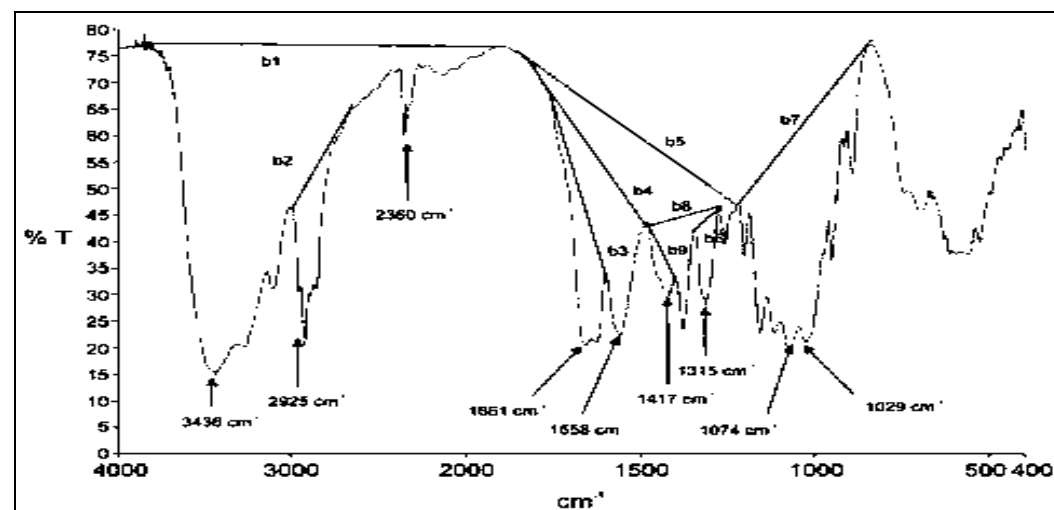


Figure 36 : Spectre IR de la chitine standard (Brugneroto et al., 2001).

Les principales bandes d'absorbance rencontrées au niveau du spectre IR de la chitine de référence ont les longueurs d'ondes suivantes : 1029 cm^{-1} , 1315 cm^{-1} , 1558 cm^{-1} , 1661 cm^{-1} , 2925 cm^{-1} , 3436 cm^{-1} .

Au regard des figures 34 et 35, il apparait que la chitine extraite par voie chimique présente des similarités importantes avec la référence, en addition des longueurs d'ondes suivantes : 1374 cm^{-1} et 3257 cm^{-1} qui caractérisent, respectivement, les vibrations : δ CH₃, δ OH et ν (NH).

Pour la chitine pure, ces fréquences ont été identifiées et commentées par de nombreuses études. Le tableau 09 situe les absorbances des principales bandes caractéristiques de la chitine standard et celle produite en laboratoire :

Tableau 09 : Les longueurs d'ondes et leurs attributions pour les principales bandes obtenues pour la chitine standard et la chitine extraite (Pawlak et al. 2003).

Modes de vibration	Longueurs d'ondes (cm^{-1})	
	Chitine standard	Chitine extraite
δ CH (CH ₃ ou CH ₂)	1315	1306
δ CH ₃ , δ OH	-	1374
δ (N-H du groupe <i>N</i> -acétyle)	1558	1553
ν CO (amide I)	1661	1619
ν (COCH ₃)	2925	2932
ν (NH)	-	3257
ν (O-H)	3436	3447

ν : Etirement (Stretching) / δ : Fléchissement (Bending).

Le spectre IR de la chitine produite a montré un pic intense à 1553 cm^{-1} qui correspond à la déformation N-H de l'amide II. Les principales longueurs d'ondes enregistrées à 1619 cm^{-1} , 1374 cm^{-1} , 1553 cm^{-1} , 3447 cm^{-1} sont attribuées, respectivement, aux vibrations de la bande amide I, déformation symétrique du groupe CH₃, N-H déformation de l'amide et l'étirement du groupe hydroxyle. Ces résultats de la FTIR montrent que tous les groupements chimiques constituant la molécule de chitine sont présents.

I.2.1.2. Le chitosane produit et le chitosane standard

Les figures 37 et 38 ci-dessous représentent, respectivement, le spectre IR du chitosane obtenu à partir de la désacétylation de la chitine et du chitosane standard (proposé par la littérature : Puvvada et al., 2012).

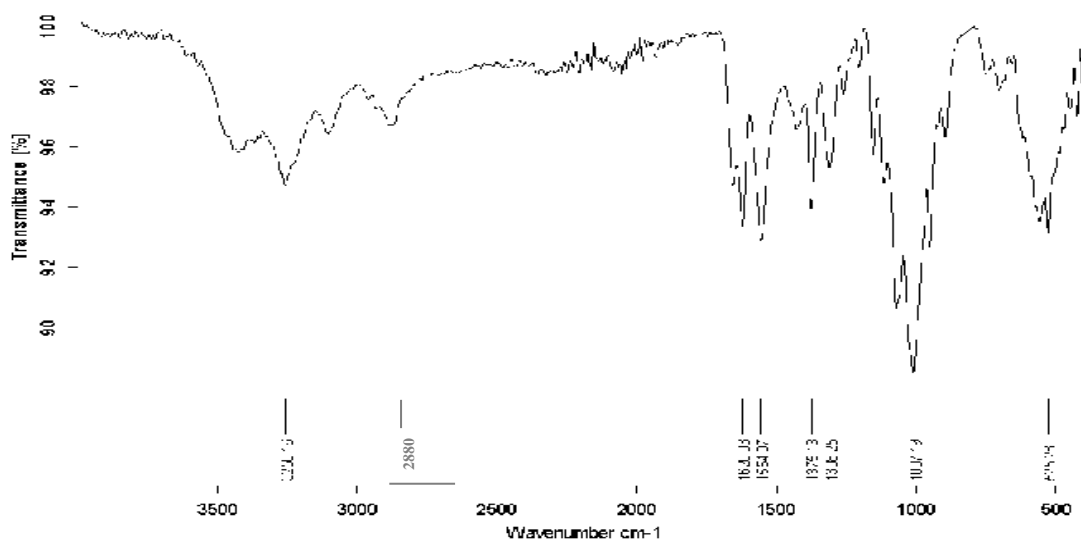


Figure 37 : Spectre IR du chitosane produit

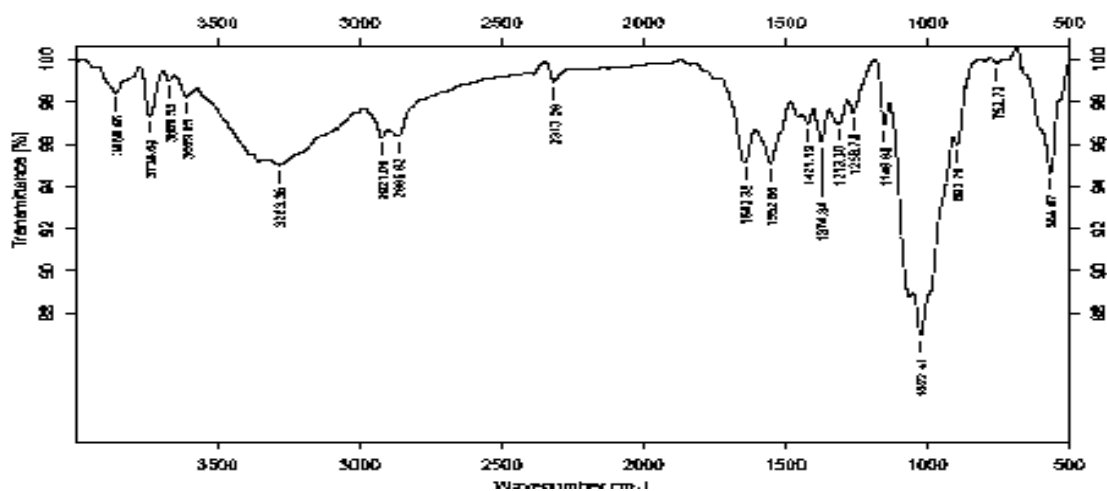


Figure 38 : Spectre IR du chitosane de référence (Puvvada et al., 2012)

Les pics d'absorbance les plus importants observés au niveau du spectre IR du chitosane de référence et du chitosane produit traduisent les principaux groupements chimiques entrant dans la composition de la molécule de ce dernier. Les détails de ces pics ainsi que les modes de vibration qu'ils présentent sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 10 : Les longueurs d'ondes et leurs attributions pour les principales bandes obtenues pour le chitosane standard et le chitosane préparé (Silverstein et al., 2003)

Modes de vibration	Longueurs d'ondes (cm ⁻¹)	
	Chitosane standard	Chitosane préparé
ν (C-O)	1026	1007
δ CH (CH ₃ ou CH ₂)	1310	1308
δ CH ₃ , δ OH	1379	1375
Amide II (NH ₂)	1555	1554
Amide I (C=O)	1661	1620
ν (CH)	2888	2880
ν (NH)	3265	3258

Les résultats obtenus par spectroscopie FTIR de la chitine et du chitosane concordent avec ceux enregistrés par Lavall et al., 2007, Kumirska et al., 2010, Kavitha et Kannadasan, 2012 et Lehtihet, 2013.

Pour les spectres IR décrits précédemment, nous remarquons que pour les couples : (Chitine standard vs Chitine extraite) et (Chitosane standard vs Chitosane produit) il y a certains pics d'absorbance qui ne se ressemblent pas ; ceci peut être expliqué par la présence de résidus tels que les protéines et les pigments organiques qui sont restés en association avec la chitine lors du processus d'extraction et pouvant influencer la position et l'intensité des pics. C'est également le cas des protéines qui possèdent des groupements fonctionnels (amines, N-acétyles et carboxyles) similaires à ceux de la chitine et du chitosane (Parabu et Natarajan, 2012).

I.2.1.3. Détermination du degré de désacétylation par spectroscopie FTIR

Cette méthode de caractérisation du chitosane par IR est basée sur la relation entre la valeur de l'absorbance (A) de l'amide primaire à 1655 cm^{-1} et celle de l'hydroxyle à 3450 cm^{-1} . Le degré de désacétylation a été calculé par l'équation (BAXTER et al., 1992; KHAN et al., 2002; TOKURA et NISHI, 1994) :

$$DD = 100 - [(A_{1655} / A_{3450}) / 1.33 * 100] \dots\dots\dots (5)$$

Où :

DD : Degré de Désacétylation

A_{1655} : Absorbance à 1655 cm^{-1}

A_{3450} : Absorbance à 3450 cm^{-1} .

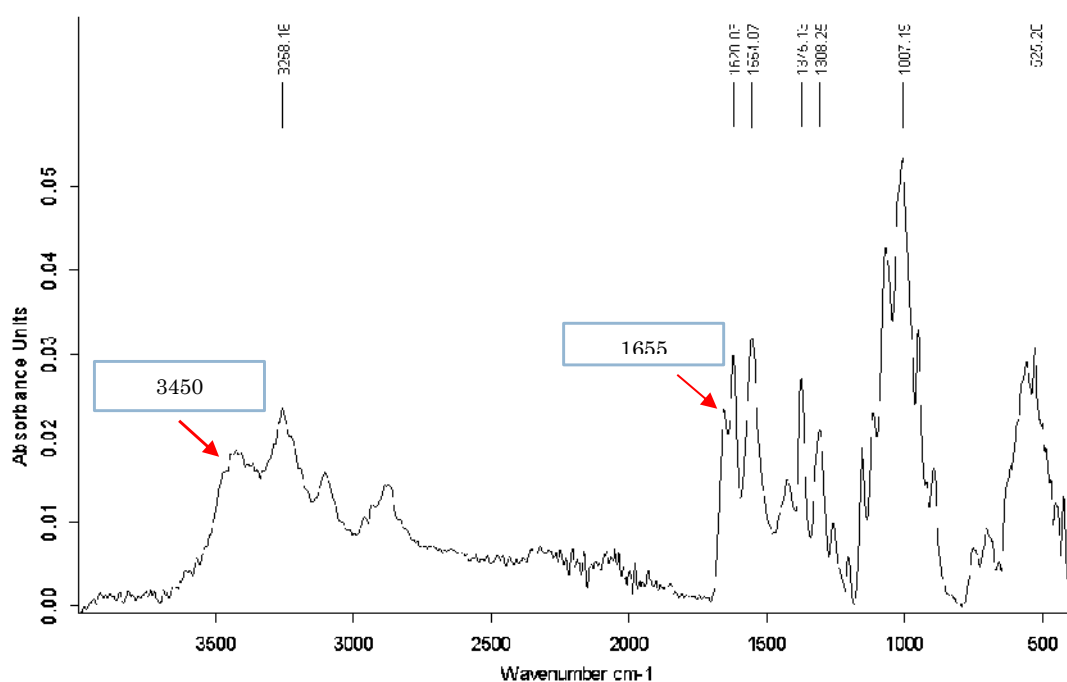


Figure 39 : Spectre IR du chitosane produit

Le rapport des aires par rapport au profil du chitosane produit en laboratoire, indiquerait le degré de pureté. D'après cette méthode, le chitosane produit par voie chimique serait pur à 84,34 %.

I.2.1.4. Détermination de la forme polymorphique de la chitine par spectroscopie FTIR

La haute cristallisation des échantillons entraîne l'apparition d'une série de pics d'absorption. La fréquence des régions carbonyle C=O des amides entre (1600 et 1500 cm^{-1}) est de grande importance car elle permet de distinguer l' α et la β -chitine. La bande correspondant à l'amide I est divisée soit en deux pics à 1656 et 1621 cm^{-1} pour l' α -chitine, soit en un seul pic à 1626 cm^{-1} pour la β -chitine. La bande de l'amide II est unique et est à 1556 cm^{-1} pour l' α -chitine et à 1560 cm^{-1} pour la β -chitine cm^{-1} .

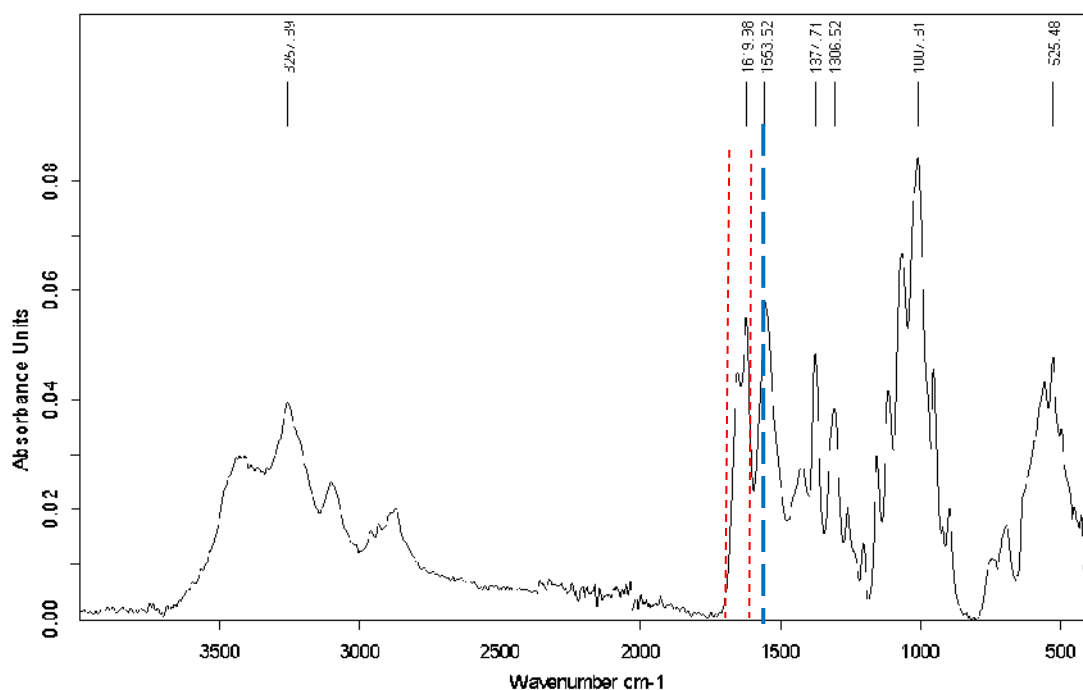


Figure 40 : Spectre IR de la chitine produite ; Bande correspondant à l'amide I (en rouge) et à l'amide II (en bleu).

Dans la figure ci-dessus, le spectre FTIR de la chitine extraite à partir des carapaces de crevettes de l'espèce *parapenaeus longirostris* démontre que cette chitine est de type α .

I.2.2. Microscopie électronique à balayage MEB

Les observations ont été réalisées à l'aide d'un Microscope Electronique à Balayage de type Quanta 400, de la firme FEI, équipé d'un détecteur de rayons X en Energie dispersive, sans azote, model OCTANE PRO, de la firme EDAX AMETEK.

I.2.2.1. Chitine extraite

Les images obtenues par la microscopie électronique à balaye de l'échantillon de chitine, avec des agrandissements différents, sont représentées sur les figures suivantes :

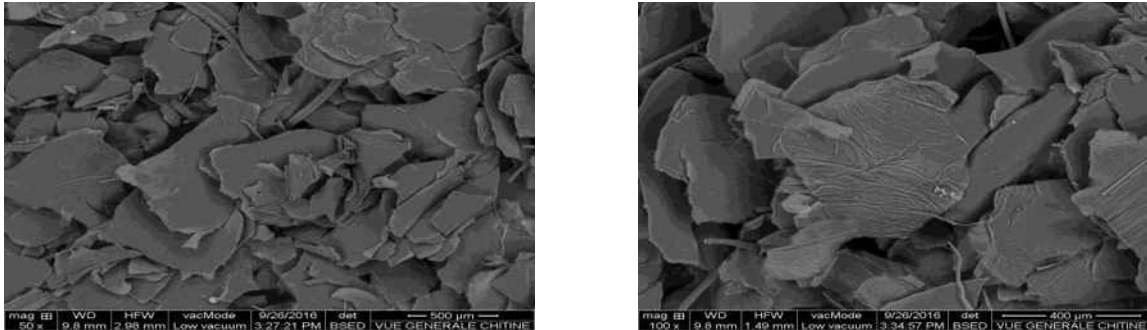


Figure 41 : Images MEB de la chitine à faible grossissement

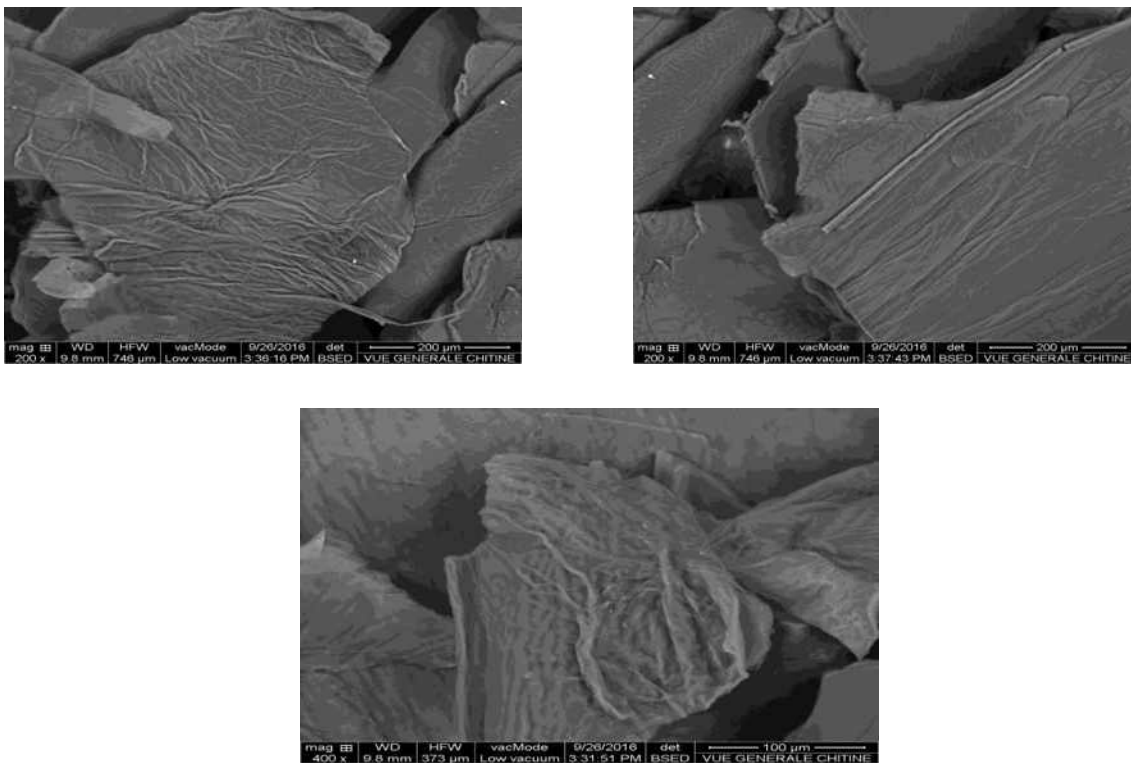


Figure 42 : Images MEB de la chitine extraite à grossissement moyen

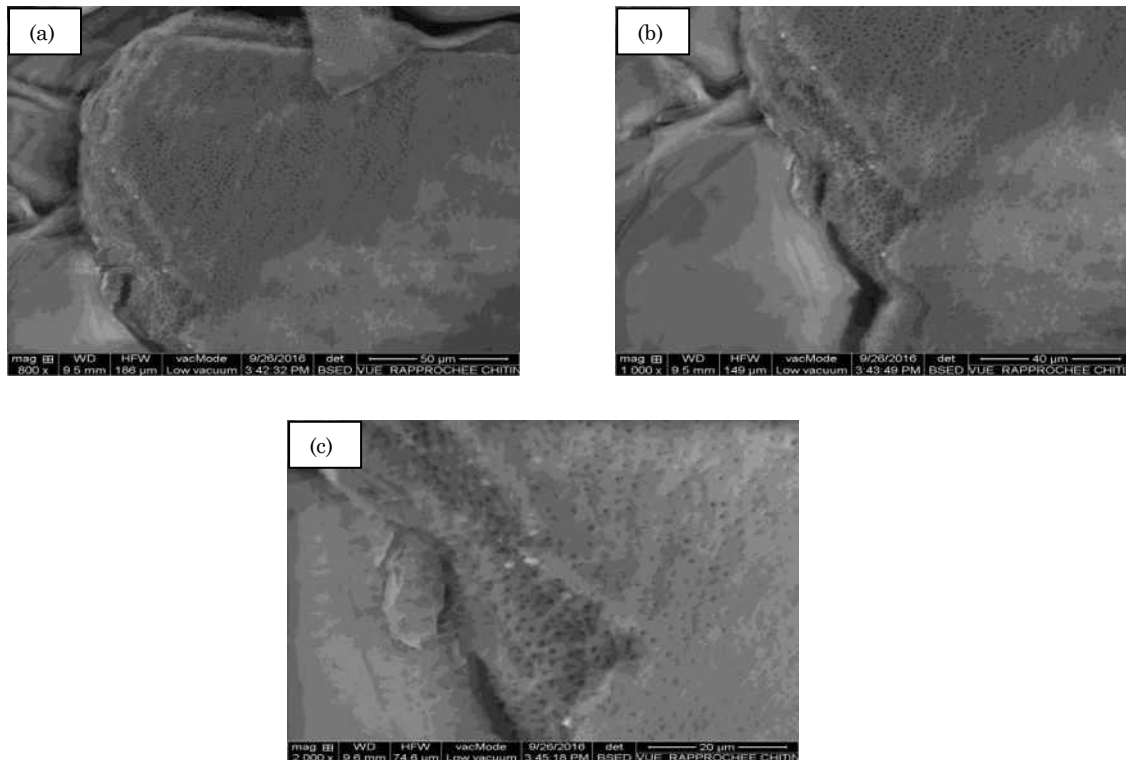


Figure 43 : Images MEB de la chitine extraite à fort grossissement

La figure 41 représente les images MEB de la poudre de chitine à faible grossissement (*50 et *100), la structure de cette dernière apparaît comme plusieurs feuilles vaguement uni-fines.

La figure 42 représente les images MEB de la poudre de chitine à grossissement moyen (*200, *400), ces images révèlent que la chitine extraite possède une structure cristalline distincte disposée sous forme d'un composé micro-fibrillaire constituée par des fibres très enchevêtrés.

La figure 43 représente les images MEB de la poudre de chitine à fort grossissement (*800, *1000, *2000), il apparaît une structure en feuille très fine renfermant des petites ouvertures sous forme de pores ; la porosité à la surface des feuilles est très importante.

Yen et al.2009 ; Paulino et al. 2006 ; Arbia et al.2012 ayant travaillé sur la structure de l'exosquelette de crustacés ont trouvé que la chitine purifiée montrait une structure micro-fibrillaire similaire.

I.2.2.2. Le chitosane produit

Les images obtenues par la microscopie électronique à balaye de l'échantillon de chitine, avec des agrandissements différents, sont représentées sur les figures suivantes :

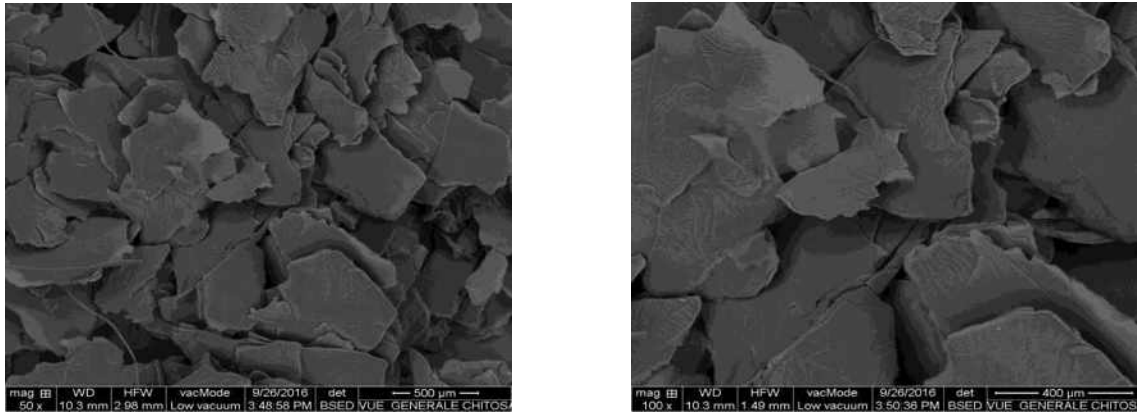


Figure 44 : Images MEB du chitosane à faible grossissement

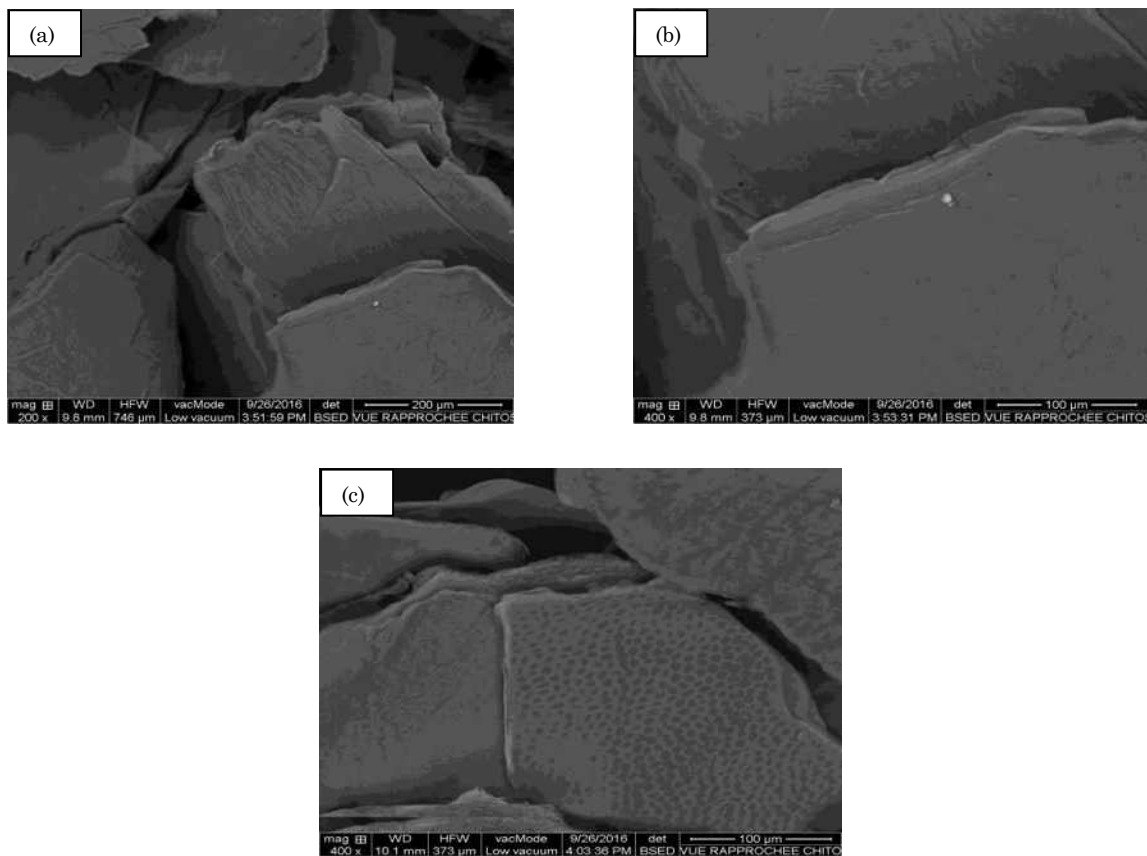


Figure 45 : Images MEB du chitosane à grossissement moyen

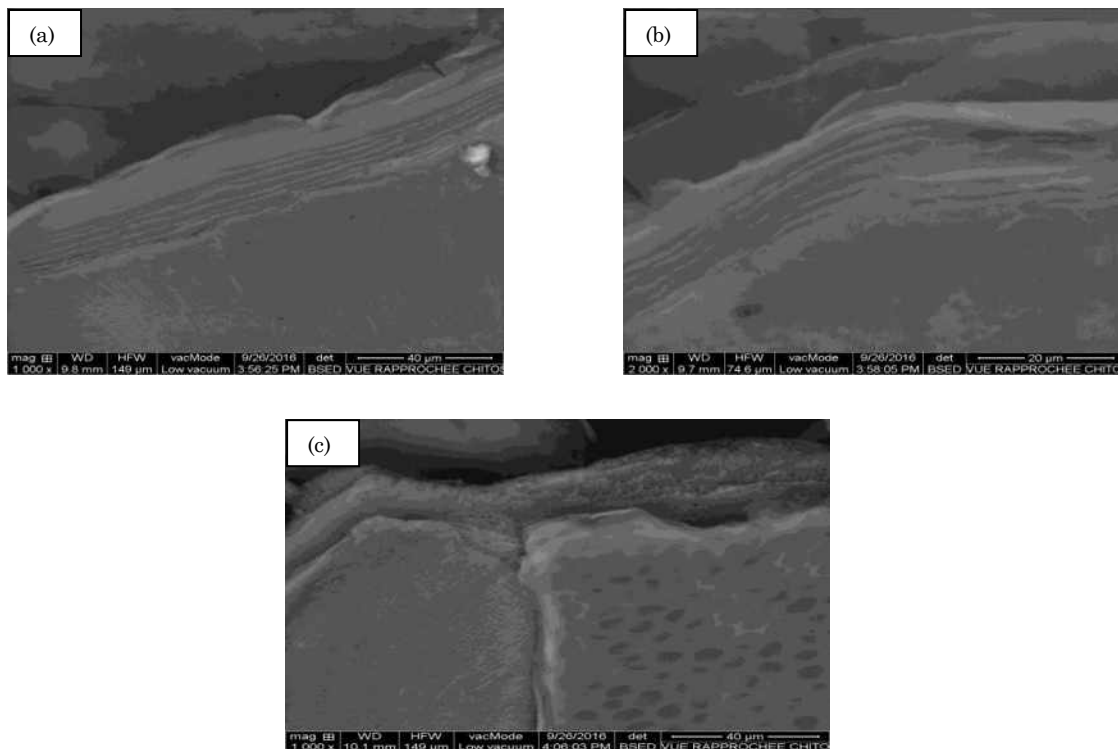


Figure 46 : Images MEB du chitosane à fort grossissement

Les images obtenues par microscope électronique à balayage MEB de la poudre de chitosane montrent que celui-ci a une structure presque similaire à celle de la chitine ; structure de microfibrilles et présence de micropores. Un grossissement (*2000) des feuilles montre que ces dernières sont composées d'un bon nombre de micro-fibrilles moins distinctes et moins enchevêtrées que celles de la chitine.

Nous remarquons que les pores présents sur la surface du chitosane sont plus nombreux et plus intenses (Figure 45 (c) et Figure 46 (c)) que ceux qui se trouvent sur la surface de la chitine (Figure 3), ceci nous permet de déduire que le chitosane est plus poreux que la chitine.

Yen et al., 2009 ; Pillai et al., 2009 ; ont observé des résultats similaires pour des chitosanes obtenus par désacétylation.

II. Echantillon de diatomite

II.1. Caractéristiques chimiques et physicochimiques

II.1.1. Teneur en humidité

Les valeurs obtenues lors de la mesure de la teneur en eau de la poudre de diatomite sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Taux d'humidité dans la poudre de diatomite

	Echantillon (1)	Echantillon (2)	Echantillon (3)	Echantillon (4)
Teneur en humidité (%)	4.89	4.89	4.97	4.78

II.1.2. La composition chimique

La composition chimique faite par la fluorescence X de cette matière première est donnée dans le tableau (11). Il ressort des valeurs de la composition chimique que la Diatomite naturelle est composée essentiellement de silice avec des impuretés de type CaO, Al₂O₃, Fe₂O₃. Le CaO se distingue par sa teneur élevée de l'ordre de 11 %. Ce taux en carbonate de calcium contamine la surface et rend l'utilisation de cette matière première dans certains domaines très difficile ; en particulier, la filtration des produits alimentaires. Ce taux très élevé en carbonate de calcium pourra être dû à d'autres organismes riches en CaCO₃ comme les bivalves. Ces résultats sont similaires à ceux de (Nikolaos, 2007).

Tableau 12 : Composition chimique de la Diatomite naturelle (Hamdi, 1998)

Composition chimique (%)	SiO₂	CaO	Al₂O₃	Fe₂O₃	MgO	Na₂O	K₂O	TiO₂	P.A.F
Diatomite naturelle (DN)	78.41	11.09	2.48	1.29	1.34	0.62	0.59	0.21	3,96

III. Cinétique de relargage du principe actif

L'essai de dissolution trouve son importance dans le contrôle d'une formulation mais aussi, pour expliquer son comportement. Il est destiné à déterminer la plus ou moins grande aptitude d'une forme galénique à laisser passer, en solution dans un milieu déterminé, le ou les principes actifs qu'elle contient. Il permet ainsi la validation des choix à faire à différents stades du développement de la forme médicamenteuse.

Après la préparation de la formulation de tétracycline comme principe actif avec les excipients de l'agar-agar, le chitosane et la diatomite, nous avons effectué le test pharmaco technique de dissolution *in vitro* pour étudier et voir l'effet de ces polymères sur la libération de ce principe actif.

III.1.Détermination de la courbe d'étalonnage

Pour cela, un spectrophotomètre UV-Visible a été utilisé pour voir l'évaluation de la concentration de la tétracycline encapsulée au cours du temps. Les absorbances de la solution de tétracycline à différentes concentrations analysées à la longueur d'onde $\lambda = 351$ nm sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 13 : variation de l'absorbance en fonction de la concentration

Solution mg/l	Absorbance
10	0.327
30	0.783
50	1.187
80	1.775
120	3.237

La courbe d'étalonnage (Figure 47) représente la variation de l'absorbance en fonction de la concentration du principe actif à la longueur d'onde $\lambda = 351$ nm.

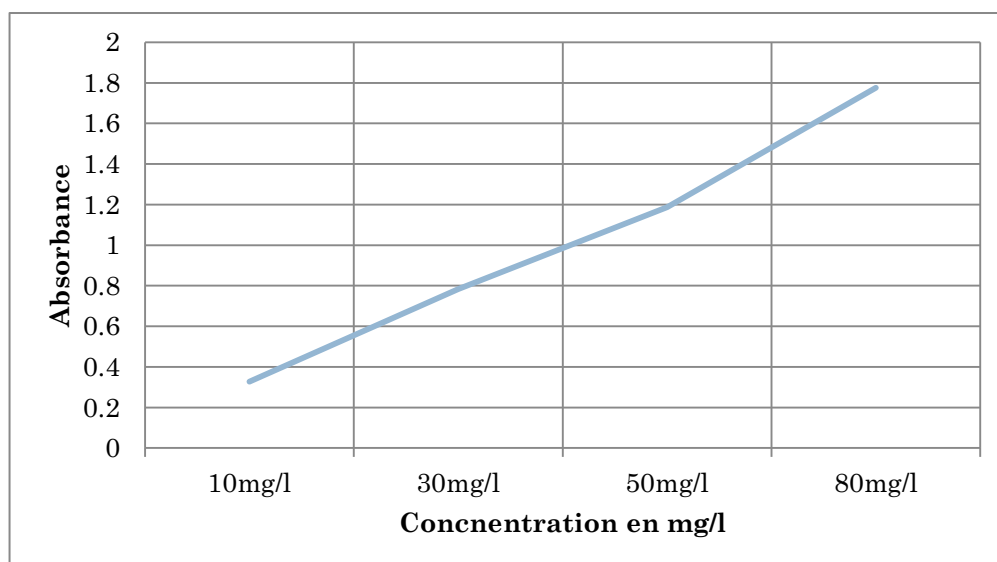


Figure 47 : courbe d'étalonnage de la tétracycline à différentes concentrations.

III.2. Etude de variation de la masse libérée du principe actif (Tétracycline)

Pour mettre en évidence l'influence des excipients susceptibles d'affecter le taux d'encapsulation, une étude comparative pour les essais de dissolution a été réalisée avec deux formulations :

(Tétracycline - Chitosane – Agar-agar - diatomite) et (tétracycline - Chitosane – Agar-agar).

Rappel : La quantité théorique maximale de tétracycline dans les deux formulations est calculée comme suit :

- **Composite (Tétracycline - Chitosane – Agar-agar - Diatomite)**

Alors on a mélangé : Agar-agar 3g + diatomite 2g + tétracycline 200mg + chitosane + CaCl₂.

Et donc : 200mg tétracycline → 5.3 g du mélange

L'analyse de 01g du mélange correspond théoriquement à 37.7 mg de tétracycline dans 100 ml d'eau distillée, c.à.d. la concentration de tétracycline est d'environ 377 mg/l.

- Composite (tétracycline - Chitosane –Agar-agar)

Ainsi de la même manière pour la deuxième formulation :

On a : 200mg tétracycline \longrightarrow 3.3 g du mélange

Et donc la concentration de tétracycline qui correspond à un 01 g du mélange est estimée environ à 606mg/l.

Le test de dissolution a été effectué à l'aide d'un agitateur memmert avec bain marie dans une température constante a été fixée à $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ correspondant à la température du corps humain. Le milieu de dissolution est un milieu gastrique artificiel composé de HCl 0.1M à pH=4.

III.3. Résultats de dissolution in vitro

Les essais de dissolution in vitro ont été réalisés selon le protocole décrit au chapitre II pendant 100 min. L'absorbance de la solution est mesurée à t_0 , puis un volume de 2ml dosé par UV-Visible est prélevé à chaque 10 mn, pour une dizaine de fois.

Les résultats de dissolution *in vitro* des différentes formulations sont regroupés dans des courbes qui sont représentées, respectivement sur les figures ci-dessous :

III.3.1. Composite (Tétracycline - Chitosane – Agar-agar - Diatomite)

Les valeurs obtenues suite au calcul de la concentration de la tétracycline dissoute à partir de la formule tétracycline – Chitosane- Agar-agar -Diatomite en fonction de l'absorbance et de l'évolution au cours du temps, sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 14 : concentration de la tétracycline dissoute à partir de la formule tétracycline - Chitosane- Agar-agar -Diatomite en fonction de l'absorbance et du temps.

T (min)	Abs	Concentration en mg/l
0	0,235	91,9486
10	0,272	106,4257
20	0,377	147,5091
30	0,6	234,7626
40	0,652	255,1086
50	0,676	264,4991
60	0,68	266,0642
70	0,713	278,9762
80	0,715	279,7587
90	0,78	305,1913
100	0,82	320,8422

La courbe de dissolution (Figure 41) représente la variation de la concentration du PA à partir de formule développée tétracycline –Chitosane – Agar-agar –Diatomite en fonction du temps. :

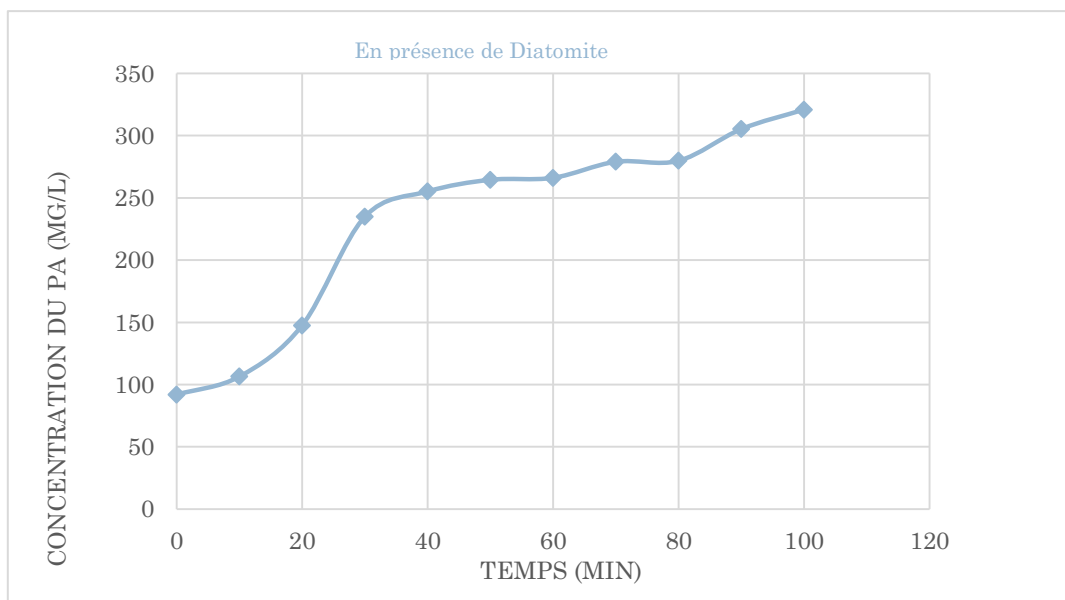


Figure 48 : courbe de dissolution de la tétracycline à partir de formule développée tétracycline Chitosane–Agar-agar –Diatomite.

III.3.2. Composite Chitosane - Agar_agar et Tétracycline

Les valeurs obtenues suite au calcul de la concentration de la tétracycline dissoute à partir de la formule tétracycline – Chitosane - Agar-agar en fonction de l'absorbance et du temps, sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 15 : concentration de la tétracycline dissoute à partir de la formule tétracycline – Chitosane- Agar-agar en fonction de l'absorbance et du temps.

T (min)	Abs	Concentration en mg/l
0	0,176	68,8635
10	0,382	149,4651
20	0,513	200,72151
30	0,616	241,0223
40	0,689	269,5850
50	0,725	283,6707
60	0,802	313,7985
70	0,875	342,3612
80	0,941	368,1850
90	0,950	371,7065
100	0,993	388,5311

La courbe de dissolution (Figure 42) représente la variation de la concentration du PA à partir du composite tétracycline –Chitosane – Agar-agar en fonction du temps :

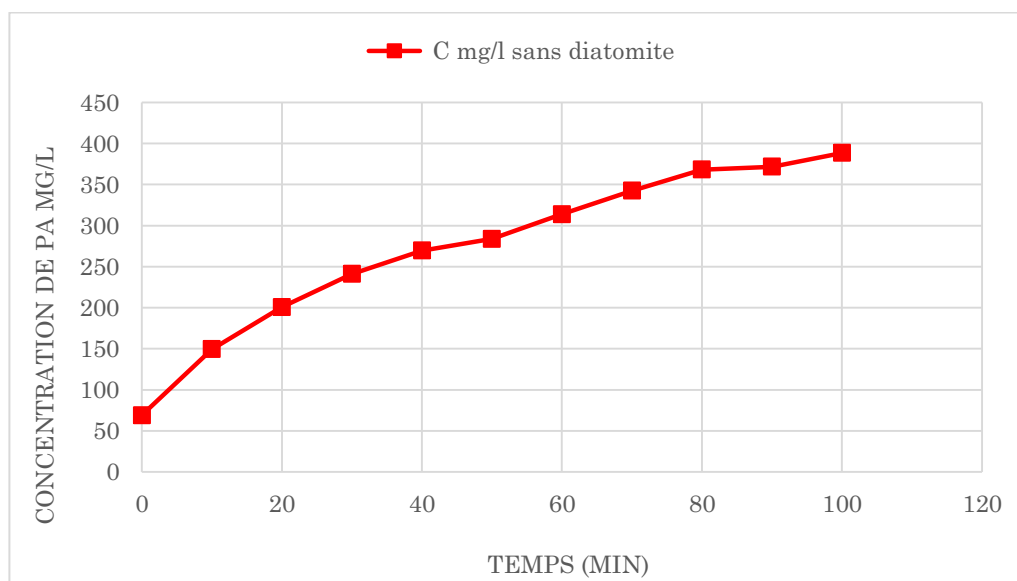


Figure 49 : courbe de dissolution de la tétracycline à partir de formule développée tétracycline Chitosane–Agar-agar.

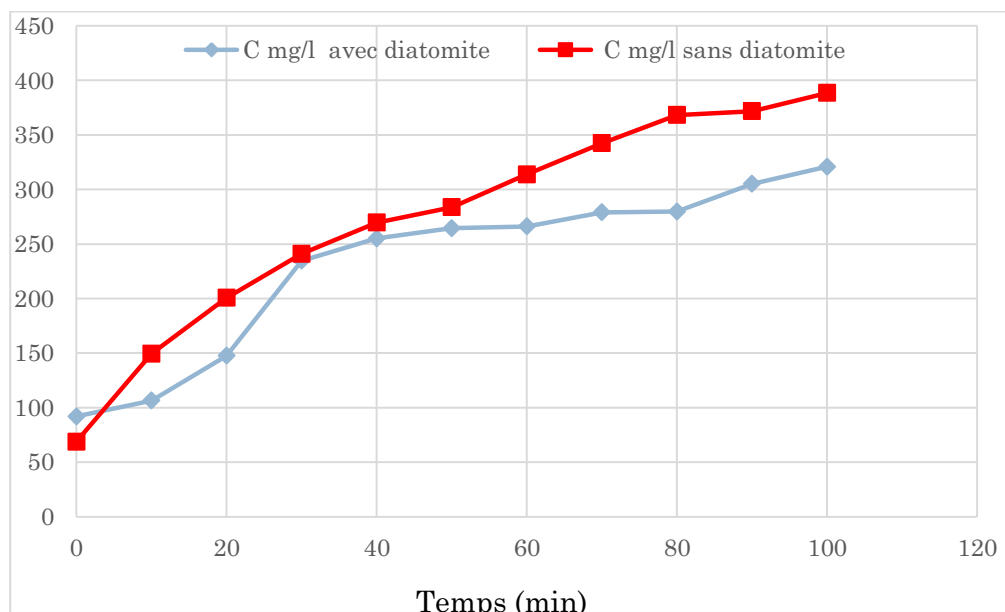


Figure 50 : superposition des courbes de dissolution de la tétracycline à partir de la formule développée Tétracycline – Chitosane – Agar-agar -Diatomite (en bleu) et à partir de la formule tétracycline – Chitosane- Agar-agar (en rouge).

III.3.3. Interprétation et discussion des résultats obtenus

La **figure 48** représente la cinétique de dissolution de la tétracycline à partir de la formule développée Tétracycline - Chitosane –Agar-agar -Diatomite.

Au regard de la figure, nous avons remarqué que la libération du **PA** est importante ; environ 65% durant les 30 premières minutes et à partir de 40 min jusqu'à 80 min, la quantité du **PA** dissoute est presque stable, de 80 min à 100 min et au-delà ; on peut dire que la formule avec ces deux excipients libère presque 87% du **PA** (tétracycline).

La libération de la tétracycline à partir de la formulation Tétracycline - Chitosane –Agar-agar s'est effectuée de façon rapide ; presque 60% du **PA** libéré au cours des 80 min d'analyse, comme il est montré dans la **figure 49**, cette vitesse de dissolution varie ensuite d'une façon assez lente à partir de 80 min jusqu'à 100 min, elle est presque stable et 66% de **PA** dissout.

La figure 50 montre les deux courbes de dissolution à partir des formulations de tétracycline. Au regard de la figure, il semblerait que le mélange Tétracycline - Chitosane –Agar-agar présente une bonne cinétique par rapport au second mélange contenant la diatomite.

Cependant, en terme de quantité dissoute ; le mélange Tétracycline - Chitosane –Agar-agar – Diatomite libère beaucoup plus le PA par rapport au mélange tétracycline – Chitosane –Agar-agar.

Ceci peut-être dû aux interactions inter moléculaire directe entre la tétracycline et la diatomite. En effet, la diatomite se compose d'un matériau amorphe et seul un petit nombre de sites actifs sont présents sur sa surface, par conséquent, le PA se trouve sur ladite surface en tant que couche amorphe plutôt que sous forme de cristaux. La dissolution de ces formulations dans l'estomac se produit rapidement et donc sa biodisponibilité peut être beaucoup plus élevée que celle d'une préparation contenant des ingrédients actifs cristallins (RESZVENYTARSASAG , ONP HOLDING SE ,2011).

Conclusion & perspectives

Conclusion

L'objectif de ce travail a été de valoriser des sous-produits marins (carapaces de crevettes) afin d'envisager leur utilisation dans le domaine pharmacologique. Ces carapaces de crevettes ont servi de source pour la synthèse du chitosane en plusieurs étapes successives : la déminéralisation, la déprotéinisation. Ce traitement a conduit à l'extraction de la chitine, laquelle est transformée par voie chimique en chitosane, après une réaction de désacétylation par une solution d'hydroxyde de sodium concentrée à 40%.

Utilisé seul dans la formulation pharmaceutique et biomédicale, le chitosane présente l'inconvénient d'être cassant, peu cohésif et érosif. Pour améliorer ses propriétés, nous nous sommes proposé d'introduire d'autres biomatériaux qui jouent le rôle de stabilisant du support et augmentent le temps de libération.

Notre ambition a été d'élaborer un complexe médicamenteux à base de chitosane associé à d'autres excipients ; la diatomite et l'agar, puis de suivre la libération du principe actif qui est la tétracycline afin de confirmer l'intérêt des excipients dans la formulation d'un médicament.

Plusieurs techniques ont été utilisées pour l'étude des propriétés physicochimiques et structurales des deux biopolymères (chitine et chitosane), telles que : FTIR, MEB.

- L'analyse par spectroscopie FTIR a confirmé la présence des principaux groupements chimiques entrant dans la composition des molécules de ces biopolymères.

Les résultats concernant la cinétique de relargage du principe actif dans les différentes formulations élaborées révèlent que la quantité et la durée de relargage du PA est étroitement liée aux excipients contenus dans le complexe médicamenteux, à leur nature, à leurs propriétés physicochimiques ainsi qu'à leurs interactions inter moléculaires.

Perspectives

Les travaux de cette étude sont loin d'être terminés et plusieurs aspects doivent être approfondis. Les résultats obtenus encouragent l'application du chitosane associé avec d'autres additifs d'origine marine dans les systèmes à libération contrôlée de médicament

pour d'autres principes actifs administrés. A cet effet nous proposons les perspectives suivantes :

- Quelques améliorations pourraient être apportées à la méthode d'extraction de la chitine par voie chimique à savoir ; répéter plusieurs fois l'opération de déminéralisation et de déprotéinisation pendant une courte durée et intercaler des phases de rinçage à l'eau distillée afin de réduire le risque d'altération du polymère.
- Les méthodes enzymatiques, plus respectueuses de l'environnement, peuvent être vues comme des méthodes de production du chitosane à l'avenir.
- S'intéresser à la synthèse du chitosane de faible poids moléculaire. D'une part, cela permet de le solubiliser dans l'eau, au lieu d'utiliser des solvants acides qui peuvent nuire aux principes actifs encapsulés, et d'autre part, la taille des nanoparticules est d'autant plus réduite que le poids moléculaire moyen du polymère est faible, ce qui augmente le taux d'encapsulation.
- Optimiser le degré de désacétylation du chitosane et rechercher une voie de synthèse utilisant des conditions plus douces, telle que le procédé enzymatique dans l'étape de désacétylation, afin d'obtenir un meilleur rendement et avec moins d'impuretés.
- Réaliser pour des expériences futures une étude de l'activité antibactérienne du chitosane associé au principe actif et aux différents excipients vis-à-vis des germes.
- Préparer des systèmes à libération prolongée à base du chitosane dissout dans l'acide Acétique à différents pH et à différentes concentrations.

Recherche bibliographique

- AINOUCHE, N. (2009).** *Ecologie, biologie et exploitation de la crevette parapenaeus longirostris (Lucas, 1846) de la région algéroise.* Thèse de magister. Ecologie en environnement marin. Alger : Université des sciences et technologies Houari Boumediene, 84 p.
- ARBIA, L. (2010).** *Contribution à l'étude de la déminéralisation et de la déprotéinisation de la carapace de crevette par voie fermentaire.* Diplôme de magister. Biotechnologie et environnement. Alger : Ecole nationale polytechnique, 69 p.
- ARBIA, W., ARBIA, L., ADOUR, L. et al. (2012).** Chitin extraction from crustacean shells by biological methods. *Food technology and biotechnology* [en ligne]. Vol 51, n° 1, p. 12-25. [Consulte le 28/09/2016]. Disponible sur le web : <<http://www.ftb.com.hr/index.php/archives/133-volume-51-issue-no-1/1068-chitin-extraction-from-crustacean-shells-using-biological-methods-a-review>>.
- BRUGNEROTTO, J., LIZARDI, J., GOYOOLEA, F.M. et al. (2001).** An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. Vol. 42. France : *Polymer*, p. 3569–3580.
- CHENOUF, A., NAFTI, Y. (2008).** *Contribution à l'étude de la cinétique de libération d'un principe actif : oxalique sodique encapsulé en vue de déterminer les conditions de conservations. Contrôle de la qualité et analyses.* Thèse d'ingénieur d'état. Djelfa : Centre universitaire Ziane Achour, p. 20-26.
- COELHO, J.F., FERREIRA, P.C., ALVES, P. et al. (2010).** *Drug delivery systems: advanced technologies potentially applicable in personalized treatments* [en ligne]. *Portugal: Pub Med.* [Consulte le 15-09-2016]. Disponible sur le web : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3405312/>>.
- CREUZET, C., AUZELY VELTY, R., RINAUDO, M. (2006).** Synthèse et étude d'hydrogels thermosensibles obtenus par modification chimique contrôlée du chitosane. *L'actualité chimique*. N° 294, 420 p.
- CRINI, G., BADOT, P.M. (2007).** Traitement et épuration des eaux industrielles polluées. France : *Presse universitaire de Franche-Comté*. 352 p.
- CRINI, G., BADOT, P.M., GUIBAL, E. (2009).** *Chitine et Chitosane Du biopolymère à l'application.* France: Presses universitaires de Franche-Comté. 303 p.
- DESBRIERE, J. (2002).** Utilisation directe Chitine et Chitosane. *L'actualité chimique* [en ligne]. Vol. 261, n° 11-12, p. 39-44. [Consulte le 10-08-2016]. Disponible sur le web : <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=14372024>> .
- DI MARIO, F., RAPANA, P., TOMATI, U. et al. (2008).** Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *International Journal of Biological Macromolecules* [en ligne]. Vol. 43, n° 1, p. 8-12. [Consulte le 10-08-2016]. Disponible sur le web : <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3405312/>>.
- DUARTE, M.L., FERREIRA, M.C., MARAVO, M.R. et al. (2002).** An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *Portugal: International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 31, p. 1-8.

- DUPASQUIER, F. (2011).** *Hydrogels physiques de chitosane pour la régénération in vivo du tissu cutané après brûlures du troisième degré* [en ligne]. Thèse de doctorat. Médecine humaine et pathologie. Lyon : Université Claude Bernard – Lyon I. p. 53-59. [Consulte le 10-06-2016]. Disponible sur le web : < <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00830801> >.
- EGYS GYOGYSZERGYAR NYILVANOSAN MUKODO RESZVENYTARSASAG, ONP HOLDING SE (2011).** Use of diatomaceous earth in the pharmaceutical industry. MIKULASIK, E., ALBRECHT, O. Hong Kong, n° .1184048
- ERHAT, H. (1973).** Itinéraires géochimiques et cycle géologique du silicium, Paris : *Doin*. 180 p.
- FAEBER, J. (2004).** Microscopie électronique à balayage Microanalyse X par sonde électronique. Strasbourg : *Institut de Physique et Chimie des Matériaux*. 53 p.
- FAO (2012).** *Evolution de la production de crustacés 2010*. In.Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO (2014).** *Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2014* .In.Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO (2016).** *Global capture production for parapenaeus longirostris*. In.Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO (2009).** *The state of world fisheries and aquaculture 2008*. In. Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FERRY, S. (2000).** L'usage du médicament. Paris : *tec et doc*. p. 68-76.
- GAZENGEL, J.M., ORECCHIONI, A.M. (2013).** *Le Préparateur en Pharmacie*. 2^e éd. France : Lavoisier. p. 1103-1162.
- GILLETT, R., (2008).** Global study of shrimp fisheries. Rome : FAO , p. 331.
- GOOLE, J. (2008).** *Développement et évaluation de mini comprimé flottants à libération prolongée* [en ligne]. Thèse de doctorat en science pharmaceutique. Belgique : Université Libre de Bruxelles. 210 p. [Consulte le 10-09-2016]. Disponible sur le web : <<https://www.ulb.ac.be/rech/inventaire/unites/ULB396.html>>
- GRIMES, S., BOUTIBA, M., BAKALEM, A. et al. (2004).** *Biodiversité marine et littorale algérienne*. Alger : Djazair, Sonatrach. p. 361.
- HAMDI, B. (1998).** *Etude physico-chimique des diatomites algériennes*, Thèse de doctorat en sciences. Alger : Université des Sciences et Technologies Houari Boumediene. 241 p.
- HAMDI, B., KESSAÏSSIA, Z., DONNET, J.B. et al. (1998).** Analytical study of physico-chemical, textural and structural of kieselguhr. *Analisis Journal*. Vol. 26, p. 8-12.
- ILER, R.K. (1979).** The Chemistry of Silica. New York : *John Wiley & Sons*. 520 p.
- JEUNIAUX, C., THOME, JP. (1990).** Production, extraction et utilisation technologique de la chitine à partir de communautés marines. Belgique : *Océanis*. Vol. 16, p. 375-382.

- KASSAI, M.R. (2007).** Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. Iran : *Carbohydr Polym* .Vol 68, n° 3, p. 477-488.
- KASSAI, M.R. (2009).** Various methods for determination of the degree of N-Acetylation of chitin and chitosan. Iran: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 575, p. 1667-1676.
- KAVITHA, R., KANNADASAN, K. (2012).** Preparation and characterization of root canal sealer with chitosan in the form of nanoparticles and nanofibers. *ResearchGate* [en ligne]. 6e Conférence internationale sur les nanomatériaux et la nanotechnologie. [Consulté sur le web le 23/09/2016]. Disponible sur le web : <https://www.researchgate.net/publication/271195575>
- KEDDOU-ADDAR, M. (2008).** *Elaboration, caractérisation et application de membranes polymères à base de chitosane*. Mémoire de magister. Chimie. Boumerdes : Université M'hamed Bougara, 66 p.
- KHABER AZI, M. (2011).** *Développement pharmaceutique de formes à libération contrôlée de tramadol à base de matrice hydrophile : Hydroxy Propyl Methyl Cellulose et Gomme Guar*. Thèse de magister. Génie des procédés pharmaceutiques. Sétif : Université Ferhat Abbas. p. 5-48.
- KHAN, T.A., PEH, K.K., CING, H.S. (2000).** Mechanical bioadhesive strength and biological evaluation of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmaceutical and Pharmaceutical Science*. Vol. 3, n° 3, p. 3003-3371.
- KIM, S.K. (2010).** Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications. France : *CRC Press*. 645 p.
- KUMIRSKA, J., WEINHOLD, M.X., THOMING, J. et al. (2011).** Biomedical activity of chitin/chitosan based materials – Influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation. *Polymers*. Vol.3. p. 1875-1901.
- LAFLAMME, P., BENHAMOU, P., BUSSIARES, G. et al. (1999).** Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. Canada: *Canadian Journal of Botany*. Vol.77, p. 1460-1468.
- LAMARQUE, G.F., CRENET, M.F., DOMARD, A.F. (2005).** Method of producing totally desacetylated chitosan with a high molecular weight. Washington : *Biomacromolecules*. Vol. 6, n° 3. p. 1380-1388.
- LAVALL, R.L., ODILIO, B.G.A., SERGIO, P. (2007).** β -chitin from the pens of *Loligo Sp.* : extraction and characterization. *Bioresource Technology*. Vol. 98, p. 2465-2472.
- LE DEVEDEC, F. (2008).** *Séparation des oligomères du chitosane par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés*. Maîtrise en chimie. Montréal : Université du Québec, 121 p.
- LE HIR, A. (2001).** *Abrégé de pharmacie galénique : bonnes pratiques de fabrication des médicaments*. 8^e éd. Paris : Elsevier. 377 p.

- LE HIR, A., CHAUMEIL, J.C., BROSSARD, D. (2009).** *Pharmacie galénique*. 9^e éd. Paris : Elsevier. Chapitre n° 2, Excipients et matériaux de conditionnement, p. 36-117.
- LE ROUX, K. (2012).** *Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevettes *Penaeus vannamei* : caractérisations des produits et optimisation du procédé*. Thèse de doctorat. Génie des procédés. France : Université de Nantes, 203 p.
- LEHTIHET MERAH, H. (2013).** *Extraction de biopolymères chitineux à partir de sous-produits de crevettes : application à la fixation des métaux lourds dans l'eau*. Thèse de magister. Océanologie et climatologie. Alger : ENSSMAL, p. 17-57.
- MAEDA, Y., JAYAKUMAR, R., NAGHAMA, H. et al. (2008).** Synthesis, characterization and bioactivity studies of novel β -chitin scaffolds for tissue-engineering applications [en ligne]. Japon: *International journal of biological macromolecules*. Vol. 42, p. 463-467. [Consulte le 10/08/2016]. Disponible sur le web : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439672>>.
- MARQUIS-DUVAL, M.F. (2008).** *Isolation et valorisation des constituants de la carapace de la crevette blanche*. Mémoire de maitre ès sciences. Québec : Université LAVAL Québec, 97 p.
- MOKRANI, N. (2013).** *Préparation et étude du comportement de membranes biopolymères : alginate de sodium/chitosane*. Thèse de magister. Génie des polymères. Boumerdes : Université M'hamed Bougara, 74 p.
- MUZARELLI, R.A.A., BOUDRANT, J., MEYER, D. et al. (2012).** Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. Elsevier. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 87, p. 995-1012.
- MUZARELLI, R.A.A. (1977).** Chitin. Oxford: *Pergamon press*. 423 p.
- NIKOLAOS, K. (2007).** Mineralogy and geochemistry of diatomite associated with ligniteseams in the Komnina Lignite Basin, Ptolemais, Northern Greece [en ligne]. Grèce : *International Journal of Coal Geology*. Vol. 71, p. 276-286. [Consulté le 23/09/2016]. Disponible sur le web : <http://www.academia.edu/27197283/Mineralogy_and_geochemistry_of_diatomite_associated_with_lignite_seams_in_the_Komnina_Lignite_Basin_Ptolemais_Northern_Greece>.
- NO, H.K., LEE, K.S., MEYERS, S.R. (2000).** Correlation between physiochemical characteristics and binding capacities of chitosan products [en ligne]. Corée: *Journal of Food Science*. Vol 65, n° 7, p. 1134-1137. [Consulte le 15/07/2016]. Disponible sur le web : <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10252.x/full>>.
- NOUAR, A. (1985).** *Contribution à l'étude de la crevette peneide *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) dans la région d'Alger : ecologie, biologie et exploitation*. Thèse de magister. Océanographie : U.S.T.H.B , 131 p.
- ONSOYEN, E., SKAUGRUD, O. (1990).** Metal recovery using chitosan [en ligne]. Norvège : *Journal of chemical technology and biotechnology*. Vol.49, p. 395-404. [Consulte le 10/07/2016]. Disponible sur le web : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1366969>>.

- PAWLAK, A., MUCHA, M. (2003).** Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends [en ligne]. Pologne : *Thermochimica Acta*. Vol. 396, n° 1-2, p. 153-166. [Consulte le 20/09/2016]. Disponible sur le web : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040603102005233> >.
- PILLAI, C.K.S., PAUL, W., SHARMA, C.P. (2009).** Chitin and chitosan polymers : Chemistry, solubility and fiber formation. Inde : *Progress in polymer science*. Vol. 34, p. 641–678.
- PUVVADA, Y.S., VANKAYALAPATI, S., SUKHAVASI, S. (2012).** Extraction of chitin and chitosan from exoskeleton of shrimp for application in the pharmaceutical industry [en ligne]. Inde: *International current pharmaceutical journal*. Vol. 1, n° 09, p. 258-263. [Consulte le 10/07/2016]. Disponible sur le web : <http://www.banglajol.info/index.php/ICPJ/article/view/11616/8498> >.
- RINAUDO, M. (2006).** Chitin and chitosan : propriétés et applications. France : *Progress in polymer science*. Vol 31, p. 603-632.
- RINAUDO, M., MILAS, M., LE DUNG, F. (1993).** Characterisation of chitosan : influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. France : *International journal of biological macromolecules* .Vol 15, n° 5, p. 281-285.
- RIVAS ARAIZA, R.N. (2010).** *Hydrogels physiques de chitosane sous forme de macro-fibres creuses et multi-membranaires : mise en œuvre et étude microstructurale* [en ligne]. Diplôme de doctorat. Matériaux polymères et composites. Lyon : Université Claude Bernard Lyon 1, 214 p. [Consulte le 15/05/2016]. Disponible sur le web : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-0088039> >.
- SECKBACH, J. & KOCIOLEK, P. (2011).** *The Diatom World*. Londre : Springer Science. 533 p.
- SHAHIDI, F., ABUZAYTOUN, R. (2005).** Chitin, chitosan and co-products : chemistry, productions, applications, and health effects. Adv. Canada: *Food & nutrition research*. Vol. 49, p. 93-135.
- SHAKEEL, A., SAIQA, I. (2016).** Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing[en ligne]. Inde : *Achievements in the Life Sciences*. Vol. 10, n° 1, p. 27-37. [Consulte le 10/08/2016]. Disponible sur le web : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2078152015300298>>.
- SILVERSTEIN, R.M., BASLER, G.C., MORILL, T.C. (2003).** Identification spectrométrique de composés organiques. Belgique : *Boeck Université*, 1^o éd. 430 p.
- SUYATAMA, N.D. (2006).** *Développement de films biodégradables à base de chitosane : étude du mélange chitosane/ PLA, de la plastification et de la compatibilisation*. France : Université de Reims. 230 p.
- SYNOWIECKI, J., AL-KHATEEB, N.A. (2003).** Production, propriétés, and some new applications of chitin and its derivatives. Pologne : *Critical reviews in food science and nutrition*. Vol. 43, n° 2, p. 145-171.

- TOKURA, S., TAMURA, H. (2007).** Chitin and chitosan. Oxford : *Johannis PK*. p. 449-475.
- TOLAIMATE, A., DESBRIERES, J., RHAZI, M. et al. (2003).** Contribution to the preparation of chitosans with controlled physico-chemical properties. France : *Polym*. Vol. 44, n° 26, p. 7939-7952.
- VARUM, K.M., SIMDSROD, O. (2004).** *Structure-property relationship in chitosan in polysaccharides : structural diversity and functional versatility*. Canada : Université de Sherbrooke. Vol. 23, p. 607.
- WANG, S.L, LIANG, T.W., YEN, Y.H. (2011).** Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. *Carbohydr Polym*. Vol. 4, n° 2, p. 732-742.
- WANG, W., XU, D. (1994).** Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degree of deacetylation. Chine : *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 16, n° 3, p. 149-152.
- WANG, X., UCHIYAMA, S. (2013).** *Polymers for Biosensors Construction*. Chine : Toonika Rincken. Chapitre n° 3, Polymers coating in biosensors. p. 230-265.
- XIAFOEI, I., KECHENG, L., RONGE, X. et al. (2015).** The production of fully desacetylated chitosan by compression method. *The egyptian journal of aquatic research*. Vol. 42, n° 1, p. 75-81.
- YEN, M.T., YANGB, J.H., MAU, J.L. (2009).** Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells [en ligne]. Taiwan : *Carbohydrate Polymers*. Vol. 75, n° 1, p. 15-21. [consulté le 25/09/2016]. Disponible sur le web : < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861708002701> >.
- YOUNES, I., RINAUDO, M. (2015).** Chitin and chitosan preparation from marine sources : structure, properties and applications. *Marine drugs*. p. 1133-1174.
- YU, S.U., PARK E.W., CHOI Y.W. (1998).** Drug release characteristics and skin irritancies of topical gels and multiple emulsion creams containing kojic acid. *Yakche Hakhoechi*. Vol 28, p. 87-92.

Annexes

1. La recherche concernant la chitine et ses dérivés

Le nombre de publications sur le thème de la chitine et ses dérivés ne cesse de s'étendre depuis 1970. Cette année-là, le nombre de publication portant sur la chitine ou le chitosane était de 40, d'après la base Scopus, alors qu'il atteint 7000 en 2013. Avant 1960, le nombre d'études publiées par an sur ce thème était inférieur à 5. La figure illustre cette évolution. D'après les conclusions de ces publications, ces produits sont promis à un bel avenir. Leurs propriétés biologiques et rhéologiques sont encore sous-exploitées par rapport à leurs potentiels, par exemple comme films alimentaires. De nombreux laboratoires s'investissent dans la mise au point de nouvelles applications, notamment dans le domaine médical. De plus, il existe un engouement pour les produits d'origine naturelle et de surcroît d'origine marine.

Au cours de l'année 2010, la littérature sur la chitine et le chitosane s'est enrichie de nombreuses revues qui constituent de réels atouts pour la poursuite des études dans ce domaine. Les laboratoires leaders se situent majoritairement en Asie, où se situe également la majorité de la production et des applications.

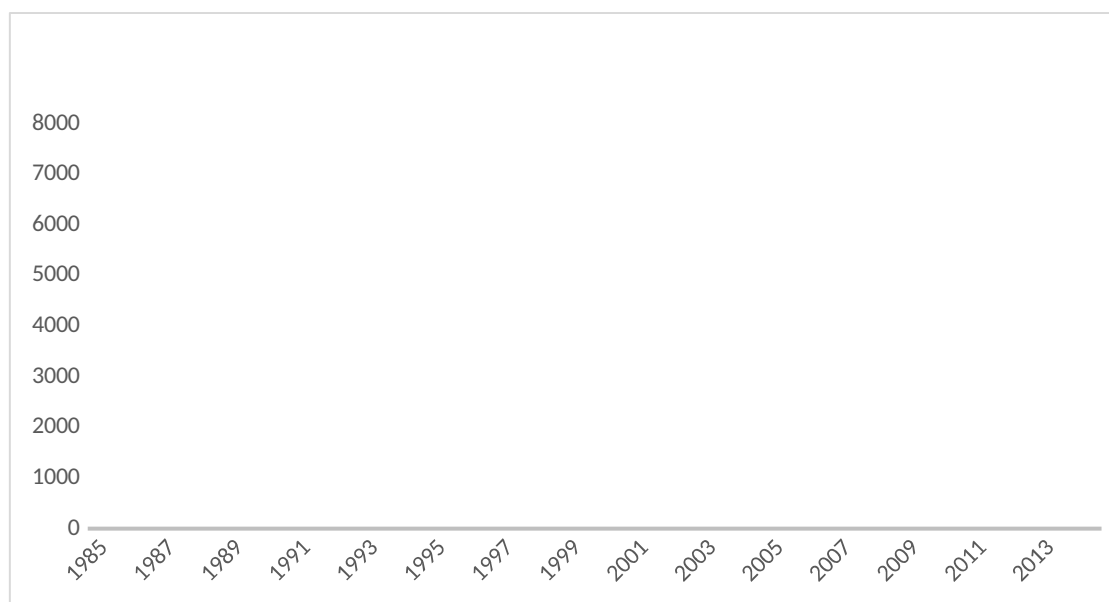


Figure 51 : Evolution du nombre de publications ayant rapport au chitosane (Source : Scopus)

2. Quelques dérivés chimiques du chitosane

Le chitosane possède des propriétés chimiques et biologiques singulières attribuées à la présence des groupes amines et hydroxyles. Ces groupes permettent des modifications chimiques du chitosane qui incluent : l'acylation ,l'alkylation ,la formation de bases de Schiff , l'alkylation réductrice ,la carboxyméthylation et lacarboxyalkylation.(Krajewska,2005 *in* Keddou,2008).La dépolymérisation appliquée au chitosane produit des oligomères de chitosane puis des unités de glucosamin

3. Production chimique de chitine

D'après l'étude réalisée par Tolaimate et al, une nouvelle approche a été proposée en utilisant des bains successifs d'HCL et de NaOH à des concentrations inférieures respectivement à 0.5 M et à 0.3 M. Cette méthode s'est révélée efficace quant à la réduction des protéines et des minéraux ainsi que la préservation de la forme native de la chitine pour les 12 différentes espèces de crustacés et de céphalopodes étudiées (tableau). Le DA varie entre 96-100 % pour toutes les espèces objet de l'étude. Par exemple pour les coquilles de crevettes le DA de la chitine extraite était de 100%.jusqu'à présent, il n'a jamais été mentionné dans la littérature un si haut DA (Younes et Rinaudo, 2015).

Tableau 16 : Comparaison de la production de chitine provenant de différentes sources selon Tolaimate et al (Younes & Rinaudo, 2015)

Source	Nombre de bains de déprotéinisation 0.3 M ; NaOH 80 °C ; 1 h	Nombre de bains de déminéralisation 0.55 M HCl ; 25 °C ; 2 h	DA
Crabe rouge	3	5	97
Crabe marbré	3	3	99
Crabe-araignée	3	3	96
Homard	3	3	-
Ecrevisse	7	3	100
Cigale de mer	3	2	-
Crevette nordique	3	3	100
Crevette grise	2	2	100
Squille	3	3	100
Calamar	2	2	100
Anatifes	4	2	100

1. Origine de la silice dans les diatomées

Les Diatomées sont des algues brunes, très abondantes dans les mers froides, qui stockent la silice. On trouve des Diatomées un peu partout : dans les lacs, sur des sols temporairement inondés par de violents orages comme c'est le cas sous les tropiques par exemple... L'incorporation de la silice se fait à travers la membrane à l'aide de la pompe Na-K soit sous forme $\text{Si}(\text{OH})_4$ ou H_4SiO_4 . Elle est consommatrice d'énergie et se fait avec l'échange d'un ion Na. La concentration des ions Na va subir un déséquilibre, ce qui risquerait de provoquer l'arrêt du processus. Mais les concentrations en ions Na et K sont maintenues de part et d'autre de la membrane cellulaire grâce à la pompe Na-K qui va donc, ici, balancer l'effet de l'incorporation de l'acide monosilicique. Pour commencer la silice se localise dans une toute petite vésicule au centre de la cellule puis va s'étendre dans le sens de la longueur suivant une voie tracée par une membrane. Une première couche de matériel dense se dépose, quand elle atteint une extrémité de la cellule elle revient vers le centre en formant un U (les 2 côtés du U forment le raphé), même chose pour l'autre moitié de la cellule simultanément ; enfin la silicalemme va fournir la trame de remplissage pour les futurs dépôts de silice de la cellule qui se fait le long des parois. On obtient donc des plaques qui ont l'aspect suivant (Figure 12)

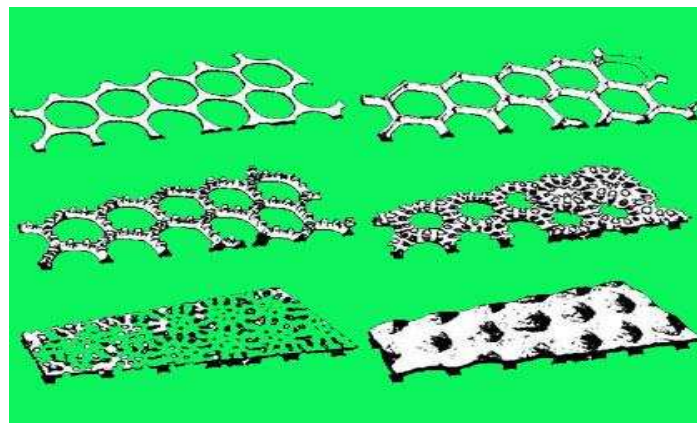


Figure 52 : Présence de la silice sur les diatomées

2. Structure des diatomées

Les squelettes de Diatomites sont constitués essentiellement de silices hydratées ($\text{SiO}_2, n\text{H}_2\text{O}$) associées à des impuretés d'oxydes minéraux (oxydes alcalins et alcalino-terreux, oxydes de fer et d'aluminium,...) et argiles (Bentonite, Kaolin, Celite).

La nature et la quantité des impuretés minérales sont souvent liées à l'origine de la Diatomite et aux différentes étapes de la formation des gisements.

La structure de Diatomite est relativement insoluble et non compressible forme une matrice poreuse de grande porosité permettant le passage du liquide et piégeant les particules en suspension (Iler, 1979).

La Diatomite naturelle est de couleur blanche ou blanc-jaunâtre, très friable sur le plan mécanique et dotée d'une résistance thermique importante.

Ces matériaux sont des adsorbants macroporeux, leurs surfaces spécifiques varient de 1 à quelques dizaines de m^2/g avec une porosité de l'ordre de 70 %. La dimension des macropores avoisine 1 μm .

Extraction de biopolymères chitineux d'intérêt pharmacologique à partir de sous-produits de pêche

RESUME

Ce présent travail consiste d'une part, à l'expérimentation d'une méthode d'extraction des biopolymères chitineux (chitine et chitosane) à partir des carapaces de crevettes et d'autre part, à élaborer de nouveaux systèmes, plus complexes à base de biopolymères permettant une modélisation et un meilleur contrôle de la cinétique de libération des médicaments. Les carapaces de crevettes ont servi de source pour la synthèse du chitosane en plusieurs étapes successives : la déminéralisation, la déprotéinisation. Ce traitement a conduit à l'extraction de la chitine, laquelle est transformée par voie chimique en chitosane, après une réaction de désacétylation par une solution d'hydroxyde de sodium. Ces produits ont été caractérisés sur le plan morphologique, structural et chimique par les techniques suivantes : La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) et la Microscopie Electronique à Balayage (MEB). Le but de ce travail a été d'élaborer un complexe médicamenteux à base de chitosane associé à d'autres excipients ; la diatomite et l'agar, puis de suivre la libération du principe actif qui est la tétracycline afin de confirmer l'intérêt des excipients dans la formulation d'un médicament. Les résultats concernant la cinétique de relargage du principe actif révèlent que la quantité et la durée de relargage du PA est étroitement liée aux excipients contenus dans le complexe médicamenteux, à leur nature, à leurs propriétés physicochimiques ainsi qu'à leurs interactions inter moléculaires.

Mots clés : Crevette, Chitine, Chitosane, Biopolymère, Médicament, Principe actif, Excipients Diatomite, Agar, Tétracycline, Libération prolongée.

SUMMARY

The present work Consists firstly in the experimentation of an extraction method of chitinous biopolymers (chitin and chitosan) from shrimp shells, and in the second part, to develop new systems, more complex, based on biopolymers for modeling and have a best control of drug release. To achieve this, wastes of shrimp shells recovered from a fish shop were washed, dried and ground. The resulting powder is then demineralized and deproteinized. This treatment leads to an extraction of chitin, by which is converted into chitosan chemically by a solution of sodium hydroxide. After isolation of biopolymers, these products were characterized morphologically; structurally and chemically by the following technics: Fourier transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM). The aim of this work was to develop a drug complex containing chitosan combined with other excipients; diatomite and Agar, and then follow the release of the active ingredient, which is tetracycline to confirm the interest of the excipients in the formulation of a drug. Results for the release of active ingredient revealed that the amount and duration of release of the active ingredient is closely related to the ingredients of the drug complex, their nature, their physicochemical properties and their inter-molecular interactions.

Keywords: Shrimp, Chitin, Chitosan, Polymer, Drug, Active ingredient, Excipients, Diatomite, Agar, Tetracycline, Controlled release.

ملخص

يهدف هذا العمل في المرحلة الأولى، الى استخلاص البوليميرات الكيتينية (الكيتين والشيتوزان) من قوقعة الجمبري. وفي المرحلة الثانية، الى استخدام البوليميرات المستخلصة في اعداد منتج جديد يسمح النمذجة والتحكم في حركية الافراج عن الأدوية. ولتحقيق ذلك تم استخدام قوقعات الجمبري للحصول على الكيتوزان و ذلك خلال الخطوات التالية : نزع الأملاح المعدنية و البروتينات. هذا العلاج أدى إلى استخراج الكيتين، التي تم تحويلها كيميائياً الى شيتوزان باستعمال هيدروكسيد الصوديوم. لقد تم درس هذه المواد الناتجة من شتى الجوانب منها المورفولوجية، الهيكلية، التكوينية و الكيميائية عن طريق التقنيات التالية: الأشعة تحت الحمراء والمجهر الإلكتروني الماسح. الهدف من هذا العمل هو صياغة دواء يحتوي على الكيتوزان مرتبط بسواغ أخرى مثل أجار و دياتوميت لتابعة الافراج عن العنصر النشط الذي هو التتراسيكلين للتأكيد عن فائدة السواغ في صياغة دواء. أظهرت النتائج المتعلقة بحركية الإفراج عن العنصر النشط أن كمية ومدة الإفراج ترتبط ارتباطاً وثيقاً لمكونات الدواء، طبيعتهم، خواصها الفيزيائية والكيميائية والتفاعلات الجزيئية بينهم.

الكلمات الرئيسية: الجمبري، كيتين، الشيتوزان، البوليمرات، الأدوية، العنصر النشط، سواغ، الدياتومايت، أجار، النتراسيكلين،
تمديد الإفراج