

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane MIRA de Bejaia



Faculté de La Technologie
Département de Génie des procédés

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de

MAGISTER

En Génie des Procédés

Option: Génie des Polymères

Présenté par

Mlle BAKOURI YASMINA

EXTRACTION ET TRANSFORMATION PAR VOIE CHIMIQUE DE LA CHITINE EN CHITOSANE. APPLICATION A L'ENCAPSULATION D'UN ANTIBIOTIQUE (COLLYRE) POUR USAGE OCULAIRE

Soutenu le: 14/07/2010

Devant le jury

Président de jury : **H. DJIDJELLI**, Professeur (U.A.M. BEJAIA)

Examineur : **F. REZGUI**, Maître de conférences (U.A.M. BEJAIA)

Examineur : **A/Z. TOUATI**, Maître de conférences (U.A.M. BEJAIA)

Rapporteur : **H. ARKOUB**, Maître de conférences (U.A.M. BEJAIA)

Invitée: **H. BELKACEMI**, Docteur (U.A.M. BEJAIA)

*Quelquefois, au milieu d'une bataille qui
Semble interminable, le guerrier a une idée
Subite et parvient à vaincre en quelques
Secondes. Alors il pense: "Pourquoi ai-je
Souffert aussi longtemps dans un combat que
Je pouvais régler avec moitié moins d'énergie
Que je n'en ai dépensé ?" En réalité, tout
Problème, une fois qu'il est résolu, paraît très
Simple. La grande victoire, qui aujourd'hui
Semble facile, est le résultat d'une série de
Petits succès qui sont passés inaperçus. Alors
Le guerrier comprend, et il dort tranquille.
Loin de se culpabiliser d'avoir mis si
Longtemps à arriver là où il voulait, il se
Réjouit de savoir qu'il est enfin arrivé.*

Remerciements

J'adresse mes plus sincères remerciements à mes chers parents, je ne trouverai jamais l'expression forte pour vous exprimer tout mon amour, ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour vos sacrifices.

Je pris Allah, le tout puissant, pour qu'il vous accorde longue vie et qu'il me pardonne la peine que je vous ai infligée durant ces années.

A mes Sœurs ; Souad, Nacéra, Biba, Sabiha et Karima,

A mon Frère Bachir.

A mon oncle et sa femme,

A mes cousins Wahib et Belkacem

A ma Grande Famille Paternelle et Maternelle.

Affectueux attachements.

C'est un agréable plaisir pour moi d'exprimer mes remerciements à Monsieur Hamid Arkoub, d'avoir accepté de diriger ce travail de recherche.

J'ai une reconnaissance infinie auprès de madame Hayet Belkacemi qui a proposé le sujet de mon mémoire ;

J'ai apprécié vos qualités humaines et professionnelles qui ont toujours suscité mon admiration.

Je remercie monsieur Hocine Djidjelli professeur à l'université A.Mira de Bejaia pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je suis particulièrement sensible au grand honneur qu'il m'a accordé en acceptant cette tâche.

Mes vifs remerciements vont également à monsieur Abdelaziz Touati maitre de conférences à l'université A.Mira de Bejaia qui nous a accueilli dans son laboratoire

pour les tests microbiologiques et d'avoir bien voulu accepter d'être examinateur de ce travail.

Je remercie monsieur Farouk Rezgui, maitre de conférences à l'université de Bejaia d'avoir accepté la fonction d'examineur dans le jury d'évaluation.

Je tiens à remercier madame Zakia Bouarriche enseignante à l'université de Bejaia et monsieur M.H Guermouche enseignant à l'université de Bab Zouar de m'avoir accordé les matières premières sur lesquelles nous avons travaillé.

Je remercie également les membres techniciens du département du Génie des Procédés pour la précieuse assistance qui a permis le bon déroulement de toutes mes analyses.

A tous mes amis en particulier; Wassila, Nora, Badrina, Aida, Nacima et Fouzia, merci à tous pour votre amitié.

Enfin je remercie tous ceux qui ont contribués de pré ou de loin à la concrétisation de ce travail.

Sommaire

Remerciements	
Table des matières	
Liste des figures	
Liste des tableaux	

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I: CONCEPTS DE BASE DES SYSTEMES A LIBERATION CONTROLEE

I. Les systèmes à libération contrôlée.....	4
I.1 Historique.....	4
I.2 Définition	5
I.3 Vitesse de Distribution	5
I.4 Avantages et inconvénients de la libération contrôlée	6
I.4.1 Avantages de la libération contrôlée	6
I.4.1 Niveau plus constant du PA.....	6
I.4.1.2 Utilisation plus efficace du PA.....	8
I.4.1.3 Administration moins fréquente	9
I.4.2 Inconvénients de la libération contrôlée	10
I.5 Principes actifs utilisés pour les systèmes à libération contrôlée	10
I.6 Facteurs influençant le développement et la performance d'une forme pharmaceutique à libération soutenue ou contrôlée.....	11
I.6.1 Volume de la dose	11
I.6.2 Solubilité dans le milieu aqueux.....	11
I.6.3 Coefficient de partage	12
I.6.4 Temps de demi-vie biologique ($t_{1/2}$)	12
I.7 Aspect fondamental de la libération contrôlée	13
I.7.1 Les polymères dans les systèmes à libération contrôlée.....	13
I.7.2 Principes du transport à travers un réseau polymérique	13
I.7.2.1 Principe général du phénomène de transport.....	13
I.7.2.1.1 Coefficient de diffusion de molécules dans les polymères.....	14
I.7.2.1.2 Relation entre structure polymérique et mécanisme de diffusion	14
I.7.2.1.3 Coefficient de partage.....	16
I.7.2.1.4 Diffusion dans les polymères hydratés.....	16
I.7.3 Matrices hydrophiles à base de polysaccharides pour libération prolongée de médicaments...	17
I.8 Différents systèmes à libération prolongée et leurs mécanismes de relargage	21

I.8.1 Systèmes contrôlés par la diffusion	21
I.8.1.1 Systèmes matriciels	21
I.8.1.1.1 Systèmes matriciels non gonflables.....	22
I.8.1.1.2 Systèmes matriciels gonflables.....	23
I.8.1.2 Systèmes réservoirs	24
I.8.1.2.1 Systèmes réservoirs à activité constante.....	24
I.8.1.2.2 Systèmes réservoirs à activité non constante.....	25
I.8.2 Systèmes osmotiques (pompe osmotique).....	25
I.8.3 Systèmes biodégradables.....	25

CHAPITRE II: LE CHITOSANE

II. Historique et découverte de la chitine et du chitosane	27
II.1 La chitine	27
II.1.1 Cristallographie de la chitine.....	28
II.1.2 Extraction de la chitine.....	31
II.1.2.1 Déminéralisation	31
II.1.2.2 Déprotéinisation	31
II.1.2.3 Blanchiment	32
II.2 Le chitosane	33
II.2.1 Production de chitosane à partir de la chitine (Processus de désacétylation)	34
II.2.2 Propriétés physico-chimiques	38
II.2.3 Hydrogels réticulés du chitosane formés par interactions ioniques	39
II.3 Propriétés biologiques de la chitine et du chitosane	40
II.3.1 La biodégradabilité.....	40
II.3.2 La biocompatibilité	41
II.3.3 La mucoadhésivité.....	41
II.3.4 Activité antibactérienne du chitosane	41
II.4 Applications générales de la chitine et du chitosane.....	42
II.5 Applications biomédicales de la chitine et du chitosane.....	43

CHAPITRE III: LES COLLYRES ET LES AMINOSIDES

III.1 Définition des collyres	45
III.2 Rappels sur l'anatomie et la physiologie de l'œil	45
III.3 Pénétration des principes actifs	47
III.4 Propriétés des collyres	48
III.4.1 Neutralité, ajustement du pH	48
III.4.2 Pression osmotique	49
III.4.3 Stérilité.....	49
III.4.4 Limites de taille des particules.....	49
III.5 Les aminosides	50
III.5.1 Structure chimique et classification	50
III.5.2 Mode d'action	50
III.5.3 Propriétés pharmacocinétiques	51
III.5.3.1 Absorption.....	51

III.5.3.2 Distribution	51
III.5.3.3 Métabolisme.....	52
III.5.3.4 Elimination.....	52
III.6 La tobramycine.....	52

DEUXIEME PARTIE : MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE ET TECHNIQUES D'ANALYSES

I. Introduction	54
I.1 Procédé d'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevettes.....	54
I.1.1 Déminéralisation.....	55
I.1.2 Déprotéinisation.....	55
I.1.3 Blanchiment.....	56
I.2 Procédé de synthèse du chitosane par désacétylation de la chitine	56
I.3 Détermination de la masse du chitosane par la méthode viscosimétrique.....	56
I.4 Détermination du degré de désacétylation (DD) du chitosane	60
I.4.1 Détermination du degré de désacétylation du chitosane par la méthode du titrage potentiométrique	60
I.4.2 Détermination du degré de désacétylation du chitosane par la spectrométrie infra rouge (FTIR)	61
I.5 Etude de la solubilité du chitosane dans l'acide acétique	61
I.5.1 Effet de la concentration.....	61
I.5.2 Effet du pH	62
I.6 Etude de l'activité antibactérienne du chitosane.....	62
I.6.1 Mode opératoire.....	62
I.6.2 Préparation de la suspension bactérienne	63
I.6.3 Tests d'activité.....	63
I.7 Préparation de formulations de la tobramycine/chitosane à différentes concentrations et pH.....	64
I.7.1 Protocole expérimental	64
I.7.2 Cinétique de diffusion	65
I.7.3 Préparation du milieu physiologique	66
I.7.4 Essai de dissolution du principe actif et contrôle cinétique par densité optique	66
I.8 Techniques de caractérisation des échantillons.....	66
I.8.1 La spectrométrie infra rouge (FTIR)	66
I.8.2 Analyse thermogravimétrique (ATG-DTG).....	67
I.8.3 Diffraction des rayons X (DRX)	67
I.8.4 Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	68
I.8.5 Caractérisation texturale	70
I.8.5.1 Isothermes d'adsorption et de désorption d'azote à 77K	70
I.8.5.2 Exploitation des isothermes d'adsorption et de désorption d'azote pour l'étude de la texture des matériaux	72

TROISIEME PARTIE : RESULTATS & DISCUSSIONS

I. Caractérisation du chitosane.....	75
I.1 Extraction de la chitine et sa transformation par voie chimique en chitosane.....	75
I.2 Détermination de la masse du chitosane par viscosimétrie	76
I.3 Détermination du degré de désacétylation du chitosane	78
I.3.1 Détermination du degré de désacétylation du chitosane par la méthode du titrage potentiométrique	78
I.3.2 Détermination du degré de désacétylation du chitosane par spectrométrie infra rouge (FTIR)	79
I.4 Etude de la solubilité du chitosane dans l'acide acétique	80
I.4.1 Effet de la concentration.....	80
I.4.2 Effet du pH	81
I.5 Caractérisations par spectrométrie infra rouge (FTIR).....	82
I.6 Analyse thermogravimétrique.....	90
I.7 Analyse par diffraction des rayons X	93
I.8 Caractérisations par la Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	94
II. Caractérisation de la tobramycine et étude antibactérienne	97
II.1 Caractérisations par spectrométrie infrarouge (FTIR)	97
II.2 Analyse thermogravimétrique	98
II.3 Analyse par diffraction des rayons X.....	99
II.4 Caractérisations par la Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	100
II.5 Etude de l'activité antibactérienne du chitosane	101
III. Cinétique de libération de la tobramycine.....	107
III.1 Caractérisation texturale.....	107
III.2 Etude de la cinétique de libération du principe actif	109
III.3 Vitesse de libération de la tobramycine en fonction de la concentration du chitosane ..	110
III.4 Etude de l'influence de quelques paramètres sur l'encapsulation de la tobramycine	111
III.4.1 Influence de la concentration du chitosane	113
III.4.2 Influence du pH des solutions du chitosane.....	115
III.4.3 Influence du poids moléculaire du chitosane.....	117
III.4.4 Influence de la composition des différentes formulations	118
III.5 Mécanisme de libération de la tobramycine	121
III.6 Rôle de la température de transition vitreuse (Tg) du chitosane et du PEG dans la libération de la tobramycine	123
III.7 Conclusion.....	124
CONCLUSION GENERALE.....	125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXE	

LISTE DES FIGURES

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I: CONCEPTS DE BASE DES SYSTEMES A LIBERATION CONTROLEE

Figure 1 : Profil typique dans l'environnement de la concentration en fonction du temps pour un PA libéré à partir d'une formulation conventionnelle.

Figure 2 : Comparaison de la fluctuation provoquée par un médicament et de ses effets secondaires sur la vision, entre un système à libération contrôlée et une médication conventionnelle à gouttes oculaires.

Figure 3 : Comparaison de la dose effective de PA en fonction du temps de demi-vie entre un système à libération contrôlée et une formulation conventionnelle.

Figure 4 : Diffusion du principe actif à travers le système matriciel.

Figure 5 : Diffusion du principe actif à travers le système réservoir.

Figure 6 : Libération de principe actif par système à pression osmotique.

Figure 7 : Diffusion du principe actif à travers le système réservoir (membrane).

CHAPITRE II: LE CHITOSANE

Figure 8: Arrangement des chaînes du polymère dans les trois formes de la chitine.

Figure 9: Structure de α -chitine : (a) projection ac ; (b) projection bc ; (c) projection ba.

Figure 10: Structure de β -chitine : (a) projection ac ; (b) projection bc ; (c) projection ba.

Figure 11: Structure chimique des molécules glucosamine sous sa forme protonée (**GlcN**) et N-acetylglucosamine (**GlcNAc**).

Figure 12: Structures de la chitine (**a**) et du chitosane (**b**).

Figure 13: Procédure générale pour l'obtention du chitosane.

CHAPITRE III: LES COLLYRES ET LES AMINOSIDES

Figure 14: Globe oculaire.

Figure 15: Structure chimique de la tobramycine

DEUXIEME PARTIE : MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE ET TECHNIQUES D'ANALYSES

Figure 16: Schéma du viscosimètre Ubbelohde.

Figure 17: Schéma d'un spectromètre de diffusion des Rayons X.

Figure 18: Représentation schématique des interactions faisceau-surface d'échantillon.

Figure 19: Différents types d'isothermes d'adsorption des gaz selon IUPAC.

Figure 20: Représentation schématique des différents pores d'un adsorbant.

Figure 21: Les trois formes possibles du diagramme-t les plus rencontrées pour l'adsorption de l'azote sur les solides.

TROISIEME PARTIE : RESULTATS & DISCUSSIONS

Figure 22: Viscosité du chitosane synthétisé.

Figure 23: Viscosité du chitosane commercial.

Figure 24: Courbe de titrage potentiométrique du chitosane synthétisé

Figure 25: Courbe potentiométrique du chitosane commercial

Figure 26: Spectre IR du chitosane synthétisé.

Figure 27: Taux de solubilité en fonction de la concentration d'acide acétique a) chitosane synthétique ; b) chitosane commercial

Figure 28: Taux de solubilité en fonction du pH de la solution d'acide acétique a) chitosane synthétique ; b) chitosane commercial

Figure 29: Spectre FTIR de la chitine et le chitosane synthétisé.

Figure 30: Spectre FTIR des chitosanes synthétisé et commercial.

Figure 31: Spectre FTIR illustrant les différences entre le chitosane synthétisé et la chitine.

Figure 32: Structure moléculaire et les liaisons hydrogènes dans α -chitine.

Figure 33: Spectre FTIR illustrant les différences entre le chitosane synthétisé et la chitine.

Figure 34: Spectre IR de la chitine : (a) type α , (b) type β .

Figure 35: Spectres des différents échantillons issus de la synthèse du chitosane.

Figure 36: Thermogrammes ATG/DTG de la chitine.

Figure 37: Themogrammes ATG/DTG, du chitosane synthétique.

Figure 38: Thermogrammes ATG/DTG du CH commercial.

Figure 39: Courbe DRX de la chitine.

Figure 40: courbe DRX du chitosane synthétisé.

Figure 41: courbe DRX du chitosane commercial.

Figure 42 : Image MEB de la chitine.

Figure 43: Images MEB du chitosane synthétisé.

Figure 44: Image MEB du chitosane commercial.

Figure 45: Spectre FTIR de la tobramycine.

Figure 46: Spectre DRX de la tobramycine.

Figure 47: Image MEB de la tobramycine.

Figure 48: Courbe de la perte de masse et la vitesse de dégradation de la tobramycine.

Figure 49: Zones d'inhibitions (a) disque de tobramycine, (b) tobramycine en solution.

Figure 50: Test d'activité pour le chitosane synthétisé.

Figure 51: Test d'activité pour le chitosane commercial.

Figure 52: Zones d'inhibition pour le CH synthétisé-tobramycine à différents volume d'injection à pH=5,8.

Figure 53: Zones d'inhibition pour le CH synthétisé-tobramycine à différents volume d'injection à pH=6,2.

Figure 54: Zones d'inhibition pour le CH commercial-tobramycine à différents volume d'injection à pH=5,8.

Figure 55: Zones d'inhibition pour le CH commercial-tobramycine à différents volume d'injection à pH=6,2.

Figure 56: Isothermes d'adsorption et de désorption d'azote pour F3 à pH=5 et 6.

Figure 57 : Diagramme-t de la formulation F3 pour le chitosane synthétisé.

Figure 58: Variation du temps de libération pour l'ensemble des formulations (pH=5).

Figure 59: Variation du temps de libération pour l'ensemble des formulations (pH=6).

Figure 60: Spectre UV de la tobramycine dans la solution du milieu physiologique.

Figure 61: Courbe d'étalonnage de la tobramycine dans la solution du milieu physiologique.

Figure 62: Cinétique de relargage de la tobramycine dans F3 et F6 pH=5 ; b) pH=6.

Figure 63: Schéma du mécanisme de gélification ionique du chitosane par le TPP.

Figure 64: Concentration de la tobramycine en fonction du poids moléculaire a) pH=5; b) pH=6.

Figure 65: Cinétique de relargage de la tobramycine des formulations F1, F2 et F3 à pH=5 ;
a) CHs, b) CHcom.

Figure 66: Cinétique de relargage de la tobramycine des formulations F4, F5 et F6 à pH=5 ;
a) CHs, b) CHcom.

Figure 67: Cinétique de relargage de la tobramycine des formulations F1, F2 et F3 à pH=6 ;
a) CHs, b) CHcom.

Figure 68: Cinétique de relargage de la tobramycine des formulations F4, F5 et F6 à pH=6 ;
a) CHs, b) CHcom.

LISTE DES TABLEAUX

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I: CONCEPTS DE BASE DES SYSTEMES A LIBERATION CONTROLEE

Tableau 1 : Exemples d'avantages des systèmes à libération contrôlée

Tableau 2 : Exemples d'avantages des systèmes à libération contrôlée

CHAPITRE II: LE CHITOSANE

Tableau 2: Sources potentielles de chitine

Tableau 3: Paramètres cristallographiques des différentes formes de la chitine

Tableau 4: Estimation de la quantité du chitosane utilisée pendant l'année 2000 (Tonnes)

Tableau 5: Principales applications du chitosane

Tableau 6: Principales propriétés du chitosane en relation avec ses applications biomédicales

CHAPITRE III: LES COLLYRES ET LES AMINOSIDES

Tableau 7: Classes des aminosides

DEUXIEME PARTIE : MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE ET TECHNIQUES D'ANALYSES

Tableau 8: Produits chimiques utilisés dans l'extraction de la chitine

Tableau 9: Valeur de 'a' correspondant aux différentes conformations du polymère

Tableau 10: Les différents solvants et constantes reliées à l'équation de Mark-Howink

Tableau 11: Quantités et volumes de polymère injectés dans les puits

Tableau 12: Quantités et volumes ajoutés des différents réactifs aux formulations

TROISIEME PARTIE : RESULTATS & DISCUSSIONS

Tableau 13: Rendements des différentes étapes d'extraction et de transformation de la chitine en chitosane

Tableau 14: Valeurs de la viscosité intrinsèque $[\eta]$ et la masse moléculaire moyenne des chitosanes synthétisé et commercial

Tableau 15: Valeurs de X, Y et le DD

Tableau 16: Les Principales bandes d'absorption IR du chitosane et leurs groupements attribués

Tableau 17: Analyse élémentaire de la chitine et du chitosane

Tableau 18: Températures de décomposition de la chitine, chitosane (synthétique et commercial)

Tableau 19: Les principales bandes d'absorption de la tobramycine et leurs groupements attribués

Tableau 20: Températures de décomposition de la tobramycine

Tableau 21: Diamètres de zone d'inhibition pour le complexe chitosane synthétisé-tobramycine

Tableau 22: Diamètres de zone d'inhibition pour le complexe chitosane commercial-tobramycine

Tableau 23: Caractérisation des pores des formulations F3 du chitosane synthétisé

Tableau 24: Surfaces spécifiques déterminées par les méthodes BET et BJH

Tableau 25: Concentrations de la tobramycine libérée des différentes formulations

Tableau 26: Valeurs de l'exposant n déterminées pour les formulations du CHs dissout à pH=5

Tableau 27: Valeurs de l'exposant n déterminées pour les formulations du CHs dissout à pH=6

Tableau 28 : Valeurs de l'exposant n déterminées pour les formulations du CHcom dissout à pH=5

Tableau 29: Valeurs de l'exposant n déterminées pour les formulations du CHcom dissout à pH=6

INTRODUCTION

Introduction

1

INTRODUCTION

Le souci principal des pharmaciens, il y a quelques décennies, était de trouver des molécules actives et d'en réduire les effets indésirables. La chimie organique de synthèse a permis de maîtriser ce domaine et d'élargir l'arsenal thérapeutique. Actuellement, rares sont les pathologies organiques pour lesquelles on ne dispose pas de traitement.

Il reste à mettre au point des formes galéniques qui permettent une bonne observance au traitement, en diminuant le nombre de prises. Ceci assure un certain confort au patient et une meilleure biodisponibilité des médicaments. En effet, il est difficile pour le patient de suivre sans erreur et sans oubli, une prescription comportant trois ou quatre prises quotidiennes.

La tâche devient encore plus difficile chez les sujets âgés caractérisés par des poly pathologies qui nécessitent à la fois plusieurs médicaments.

Les formes à libération modifiée permettent de diminuer le nombre de prises en gardant des taux sanguins efficaces, sans déborder vers les concentrations inefficaces ou toxiques. En effet, en contrôlant la cinétique de libération du principe actif à partir du réservoir médicamenteux, on contrôle la cinétique d'absorption et par conséquent encore mieux les taux sanguins.

Certains principes actifs, grâce à leurs propriétés pharmaceutiques et pharmacodynamiques (demi-vie longue, marge thérapeutique large), permettent d'obtenir des taux plasmatiques constants sans précautions particulières. Les molécules dont la demi-vie est brève et la marge thérapeutique étroite, nécessitent des mesures très strictes : le médicament doit être administré à des doses précises et à des intervalles de temps réguliers, nécessitant parfois un réveil nocturne du malade. Dans ces cas, la présentation du médicament sous forme « à libération modifiée » s'impose. Mais pour qu'une molécule soit présentée sous une telle forme, elle doit satisfaire à certaines conditions :

- Demi-vie biologique brève,
- Marge thérapeutique étroite,
- Activité pharmacologique à faible dose,
- Faible métabolisation lors du phénomène du premier passage hépatique.

Plusieurs moyens sont utilisés pour avoir une libération modifiée, allant de la programmation de la libération dans le lieu jusqu'à un contrôle de la vitesse de libération [1].

A cet effet les polymères biodégradables représentent des outils de choix, pour leur usage dans ce domaine. Leur utilisation est requise là où l'application nécessite leur résorption, après accomplissement de leur tâche. Plusieurs applications ont été développées pour ce type de polymères dans la chirurgie reconstructive, le cardio-vasculaire, les systèmes de libération de médicaments, l'ophtalmologie, etc.

En tant que véhicules médicamenteux, les nanoparticules à base de ces polymères biodégradables, sont dotées de propriétés physico-chimiques permettant d'incorporer ou de lier des substances actives. Ce lien conduit généralement à la formation d'une structure capable de protéger l'agent d'intérêt, des conditions et environnement hostiles du vivant. De plus, elles permettent d'être utilisées d'une manière ciblée. C'est-à-dire, que ces nanoparticules sont capables de se dégrader dans un environnement précis, là où la libération de la substance active est requise dépendamment de leur structure et propriétés. Parmi les polymères biodégradables, le chitosane un polysaccharide versatile a fait l'objet de plusieurs études pour ses potentiels d'utilisation en biomédical, son origine naturelle, sa disponibilité et sa biocompatibilité suscitent l'intérêt de plusieurs chercheurs pour des applications pharmaceutiques [2].

La tobramycine est un antibiotique de la classe des aminosides traitant les infections oculaires causées par les germes *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus species*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter* et d'autres micro-organismes. Ce principe actif, quand il est présenté sous forme de collyre, il contient 25-50µl/goutte, mais après instillation uniquement 10 à 25µl qui sont retenues par la conjonctivite et le film lacrymal. Au bout de 5min, il en reste que 20% de la quantité administrée, toutefois l'autre fraction est lavée par les larmes, balayée par les paupières puis évacuée par les voies lacrymales, où la perméabilité des canaux la conduit finalement dans les fosses nasales. De ce fait, pour compenser la diminution de la biodisponibilité du principe actif en question, plusieurs prises du médicament par jour sont nécessaires. Dans cette optique, la possibilité d'avoir recours aux systèmes à libération contrôlée, par incorporation de la tobramycine dans un polymère biodégradable, surtout ne présentant aucune toxicité pour l'œil vue sa sensibilité, le choix du chitosane est crucial; car en plus de sa biodégradabilité, sa biorésorbabilité, sa non toxicité et surtout son effet bactériostatique, il présente une propriété très intéressante qui est sa mucoadhésivité. A cet effet, plusieurs formulations à effet prolongé tobramycine/chitosane, ont été élaborées dans ce travail comportant les parties suivantes:

La première partie est consacrée à la recherche bibliographique, où on a rassemblé des généralités décrivant les différents systèmes de libération des principes actifs, le chitosane et la tobramycine.

Dans la deuxième partie, nous exposons le matériel utilisé dans le cadre de cette étude et les différents protocoles expérimentaux ainsi que les méthodes d'analyses qui sont largement détaillés pour une bonne quantification des résultats obtenus.

La troisième partie comporte la présentation et la discussion des différents résultats obtenus concernant :

- La caractérisation physicochimique du chitosane (synthétisé et commercial) et le principe actif, ainsi que l'étude antibactérienne,
- Etude de la cinétique de libération de la tobramycine (antibiotique) dans des conditions simulant l'environnement physiologique du compartiment oculaire des différentes formulations à effet prolongé, élaborées à base du chitosane synthétique et commercial solubilisés à deux pH 5 et 6 dans l'acide acétique à 1%, afin de mettre en évidence les facteurs qui influencent le mécanisme de libération de la tobramycine.

PREMIERE PARTIE: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I	_____	4
Chapitre II	_____	27
Chapitre III	_____	45

CHAPITRE I: CONCEPTS DE BASE DES SYSTEMES A LIBERATION CONTROLEE

I. Les systèmes à libération contrôlée

I.1 Historique

En médecine humaine, la recherche sur les systèmes à libération contrôlée a commencé sous forme de curiosité vers la fin des années 60 pour devenir, de nos jours, un domaine majeur et une véritable industrie [3]. Pendant les trois dernières décennies, la recherche dans le domaine de la libération contrôlée de médicaments s'est beaucoup concentrée sur la maîtrise de la vitesse de libération d'un agent thérapeutique pour maintenir des concentrations sériques efficaces d'un point de vue pharmacologique et ce pour une période de temps prolongée [4]. De nos jours, la technologie en libération contrôlée est capable d'obtenir des cinétiques d'ordre zéro sur de longues périodes. Certains systèmes ne permettent la libération d'un médicament, que dans les conditions physiologiques environnementales caractéristiques au profil pathologique visé [5]. Parmi les premiers systèmes implantables à libération contrôlée mis sur le marché en médecine humaine, on retrouve d'une part un implant à base de silicone (**Norplant®**) contenant du Levonorgestrel, molécule de contraception chez la femme, et d'autre part, un implant PLGA contenant un agoniste du facteur de libération de l'hormone lutéinisante (LHRH) pour le traitement du cancer de la prostate [5,6].

D'un point de vue général, la croissance exponentielle de l'industrie des polymères après la deuxième guerre mondiale, a permis la découverte de nombreux matériaux avec des propriétés fort intéressantes. Cependant, une approche scientifique plus judicieuse est actuellement appliquée avec une conception de polymères spécifiques aux applications biomédicales visées [7].

I.2 Définition

Le terme "libération soutenue" a été constamment utilisé pour décrire les formes pharmaceutiques formulées pour prolonger la libération d'un agent thérapeutique. D'autre part, le terme "libération contrôlée" implique une prédiction et reproductibilité de la cinétique de libération

d'un PA [8]. Le terme "libération contrôlée" a, cependant, été souvent utilisé pour référer à une libération soutenue.

Par définition, le rôle d'un système à libération contrôlée est de délivrer la bonne quantité d'un principe actif au bon endroit et au bon moment. En effet, la voie et le mode d'administration, la durée et le site d'action de l'agent sont autant de facteurs à considérer. En fait, la manière d'administrer un principe actif est aussi importante que le principe actif lui-même. Augmenter la sélectivité du site d'action permet d'éviter au principe actif de devoir traverser plusieurs barrières biologiques avant d'arriver à son récepteur. Ces barrières peuvent être la muqueuse intestinale (tractus gastro-intestinal), les protéines plasmatiques, l'élimination par voie lymphatique, l'effet de premier passage hépatique ou encore la barrière hémato-encéphalique. D'un point de vue pharmacocinétique, avec une formulation conventionnelle, la molécule est libérée immédiatement entraînant un pic sérique élevé voire toxique. Ensuite, la concentration décline plus ou moins rapidement en fonction du métabolisme de la molécule, ce qui peut donner lieu à une période d'inefficacité jusqu'à l'administration suivante du médicament ou imposer son administration à un rythme inadapté au patient, mettant en péril le suivi et la réussite du traitement. Le seul moyen d'éliminer les pics et les creux des concentrations plasmatiques d'une thérapie conventionnelle, était une perfusion intraveineuse permanente, méthode lourde et onéreuse. Par contre, un système à libération contrôlée permet de maintenir la concentration sérique d'un principe actif, incluse dans sa marge thérapeutique sur une longue période et avec une seule administration. Les nombreux systèmes à libération contrôlée jusqu'à maintenant commercialisés sont administrés essentiellement par voie orale ou transdermique [9].

I.3 Vitesse de Distribution

Le profil de distribution donné par un système de libération contrôlée peut varier de manière considérable. Cependant, la majorité des profils de libération peuvent être classés selon trois types :

a) Dans le cas le plus simple, la vitesse de libération reste constante jusqu'à ce que le principe actif (PA) s'épuise du dispositif. Mathématiquement, la vitesse de libération dM_t/dt du système est donnée par :

$$\frac{dM_t}{dt} = k \dots\dots\dots [1]$$

Où k est une constante, t est le temps, et M_t est la masse de PA libéré. Ce type de libération s'appelle **libération d'ordre zéro**.

b) Un second type de cinétique de libération assez commun est la libération de premier ordre. La vitesse de libération est dans ce cas proportionnelle à la masse du PA contenue la forme pharmaceutique. La vitesse de libération s'exprime alors par:

$$\frac{dM_t}{dt} = k(M_0 - M_t) \dots\dots\dots [2]$$

Où M_0 est la masse du PA dans le dispositif au temps zéro. Ainsi pour la libération de premier ordre, la vitesse diminue exponentiellement en fonction du temps, jusqu'à l'épuisement du PA.

c) Le troisième profil de libération, nommé souvent libération racine carrée du temps $t^{-1/2}$ correspond à une libération de PA proportionnelle à la racine carrée du temps. La vitesse de libération est alors définie par :

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{k}{\sqrt{t}} \dots\dots\dots [3]$$

I.4 Avantages et inconvénients de la libération contrôlée

Les systèmes à libération contrôlée offrent des avantages majeurs comparés aux formulations conventionnelles qui délivrent tout le PA sur une courte durée de temps, néanmoins elles regroupent quelques inconvénients.

I.4.1 Avantages de la libération contrôlée

I.4.1.1 Niveau plus constant du PA

Un avantage de l'administration contrôlée peut être apprécié en examinant la figure 1. Dans cette figure, les taux plasmatiques d'un PA sont décrits en fonction du temps, suite à l'administration d'une formulation conventionnelle. Typiquement, suite à l'administration du PA, la concentration augmente rapidement au début jusqu'à un maximum. Le niveau diminue ensuite lentement à cause du métabolisme, de l'excrétion ou de la distribution tissulaire du PA.

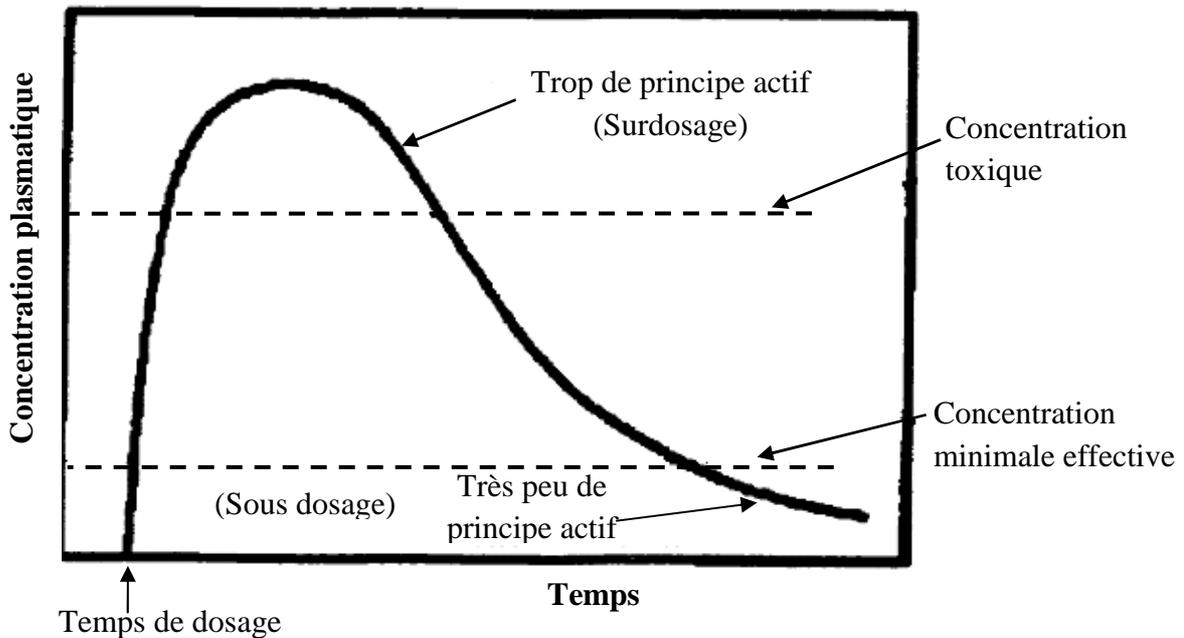


Figure 1 : Profil typique dans l'environnement de la concentration en fonction du temps pour un PA libéré à partir d'une formulation conventionnelle [10]

Dans la figure précédente, deux importants niveaux de concentration sont illustrés : la concentration minimale effective et la concentration toxique, au delà de laquelle des effets secondaires indésirables se produisent. Par conséquent, il est très important de garder la concentration du PA entre le minimum effectif et le niveau toxique. Un tel contrôle est difficile avec les formulations conventionnelles à cause des problèmes de surdosage et sousdosage qui y sont associés. Le rapport entre les niveaux effectif et toxique est connu sous le nom d'**Index thérapeutique (IT)**, défini par :

$$IT = \frac{\text{Concentration toxique minimale}}{\text{Concentration effective minimale}} \dots\dots\dots [4]$$

Les systèmes à libération contrôlée offrent la possibilité de contourner les problèmes de surdosage et sous dosage. Ces systèmes peuvent être conçus pour que la vitesse de libération du médicament suive de près sa vitesse d'élimination. **Thewes et Bayne** ont quantifié ce concept à l'aide de l'**Index de Dosage (ID)**, défini par le rapport de la concentration maximale à la concentration minimale durant un cycle de dosage [11].

$$ID = \frac{\text{Concentration maximale par cycle de dosage}}{\text{Concentration minimale par cycle de dosage}} \dots\dots\dots [5]$$

Un système à libération contrôlée bien conçu doit alors avoir le plus faible ID possible, certainement plus faible que l'index thérapeutique du PA.

Une comparaison de la fluctuation du niveau de médicament et de ses effets secondaires sur la vision, entre un système à libération contrôlée et une médication conventionnelle à gouttes oculaires est illustrée à la Figure 2. Une diminution significative de l'incidence des effets secondaires est clairement observée avec le système à libération contrôlée.

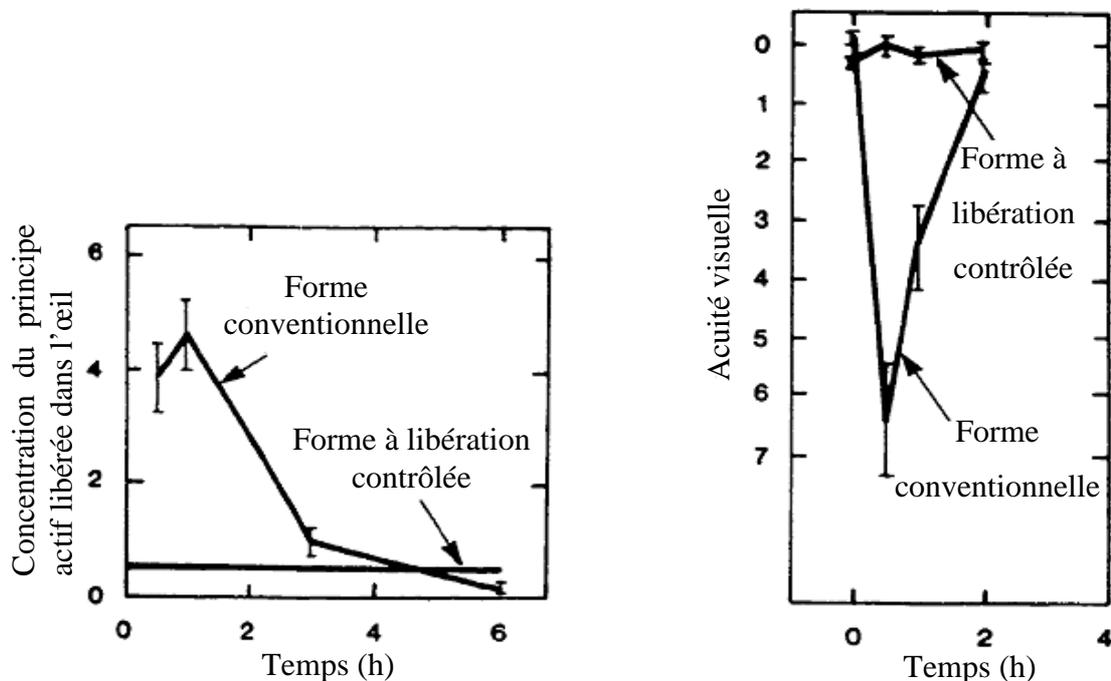


Figure 2 : Comparaison de la fluctuation provoquée par un médicament et de ces effets secondaires sur la vision, entre un système à libération contrôlée et une médication conventionnelle à gouttes oculaires [12]

I.4.1.2 Utilisation plus efficace du PA

Un système à libération contrôlée libère généralement le PA à des niveaux approximativement constants. Considérons, par exemple le cas d'un PA contenu dans une forme conventionnelle à libération immédiate qui s'élimine selon une cinétique de premier ordre. La figure suivante illustre la variation de la dose M_0/M_e en fonction du temps de demi-vie pour ce système. Où M_0 est la masse du PA dans le dispositif à temps zéro et M_e est le niveau minimal effectif du PA. Le graphe montre qu'un système à libération contrôlée est toujours plus efficace qu'une dose simple.

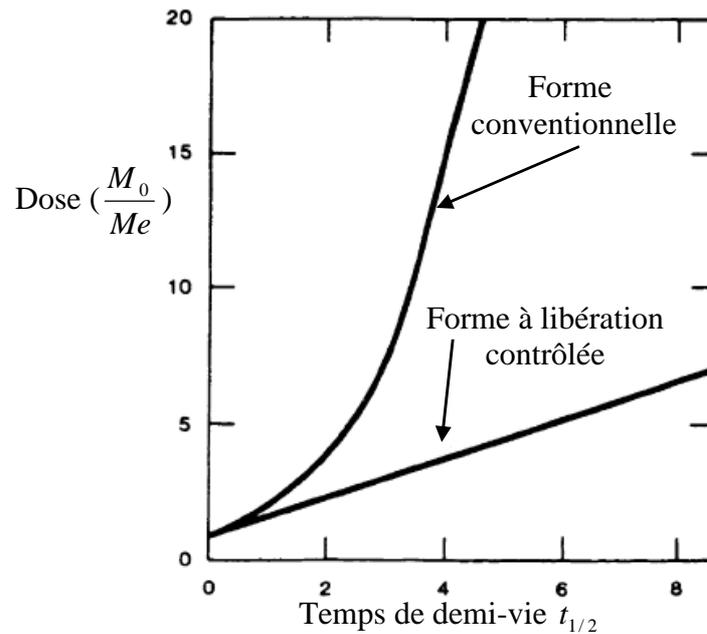


Figure 3 : Comparaison de la dose effective de PA en fonction du temps de demi-vie entre un système à libération contrôlée et une formulation conventionnelle

[12]

I.4.1.3 Administration moins fréquente

Une diminution de la fréquence d'administration mène en général à une amélioration du confort du patient comme, par exemple, lors de traitements préventifs de longue durée contre la récurrence de maladies. Certains exemples d'avantages des systèmes à libération contrôlée sont illustrés sur le tableau 1.

Tableau 1 : Exemples d'avantages des systèmes à libération contrôlée

<i>Médicament</i>	<i>Avantages</i>
Lévodopa	Élimine les mouvements involontaires liés à la posologie.
Nitroglycérine	Diminution de la dose requise et réduction de la fréquence et intensité des crises d'angine.
Aspirine	Élimine l'irritation gastrique et l'érosion.
Sulfate ferreux	Élimine l'irritation gastrique et l'érosion.
Amnophylline	Élimine l'irritation gastrique et l'érosion.
Chlorure de potassium	Élimine l'irritation gastrique et l'érosion.
Chlorure de sodium	Élimine nausée et vomissement.
Scopolamine	Réduit les effets secondaires tels que la sécheresse buccale transitoire.
Procaïnamide	Élimine le besoin d'un dosage toutes les 3 h, nécessaire pour prévenir des fluctuations plasmatiques > 50%.

I.4.2 Inconvénients de la libération contrôlée

L'utilisation des formes à action prolongée comporte certains inconvénients tels que la difficulté d'interrompre instantanément le traitement en cas d'intolérance ou d'intoxication, le risque de surdosage dû à un mauvais usage (mastication, broyage, etc.) ou à un défaut de fabrication (par exemple, systèmes réservoirs), les coûts élevés de fabrication, et la possibilité réduite d'un ajustement des doses [10].

I.5 Principes actifs utilisés pour les systèmes à libération contrôlée

Une littérature détaillée dans ce domaine montre que plusieurs principes actifs peuvent être formulés dans des polymères comme systèmes à libération prolongée, il s'agit généralement des molécules dont la thérapie curative nécessite une utilisation à long terme du principe actif, ou encore celle qui perd son efficacité thérapeutique suite à la dégradation ou à la dénaturation causée par l'acidité et les enzymes des fluides gastro-intestinaux. D'autre type de molécules fait appelle au système à libération dite ciblée, se sont généralement des principes actifs qui nécessite la

vectorisation de la molécule pour une application ciblée au niveau des récepteurs pathologiques, les médicaments les plus en vogue pour ce type d'application sont les anti-cancéreux.

Une large étude a montrée que plusieurs travaux ont été consacrés pour ce type de système, on trouve **Veena B.V** qui s'est intéressé à l'incorporation de la caféine dans une matrice à base d'amidon [13]. **Conti S** a étudié la diffusion du Diltiazem HCl mélangé à une matrice de polymère composée de l'hydroxypropylméthylecellulose (HPMC) et dérivé de cellulose ionique [14]. **Proikakis C.S** un autre auteur qui a contribué à l'étude des mécanismes de relargage de principes actifs de différentes natures (Propanol HCl, Diclofénac sodique, Acide salicylique et Sulfasalazine) mélangés au polyacide lactique [15]. **Schierholz J.M** à travaillé sur l'encapsulation du chlorhydrate de metformine de la classe des hypoglycémiant dans la cyclodéxtrine [16] et **Idrissou Y** a utilisé le polyacide lactique pour son encapsulation [17].

I.6 Facteurs influençant le développement et la performance d'une forme pharmaceutique à libération soutenue ou contrôlée

I.6.1 Volume de la dose

Un problème très fréquent lors du développement d'une forme pharmaceutique à libération soutenue est le volume de PA qui doit être administré. Les principes actifs à dose orale simple de plus de 0.5 g sont considérés comme de mauvais candidats pour la libération contrôlée par voie orale [18] à cause du large volume de la forme pharmaceutique à réaliser.

I.6.2 Solubilité dans le milieu aqueux

Les extrêmes dans la solubilité aqueuse d'un PA sont en général peu souhaitables lors de la préparation de formes à action prolongée. La raison principale de cette restriction est reliée à la vitesse de dissolution du médicament. Un PA faiblement soluble dans l'eau présente des problèmes dans la conception d'un système à libération contrôlée, puisque la disponibilité du PA sera déjà contrôlée par sa vitesse de dissolution. Dans certains cas, la diminution de la taille des particules à moins de 1 micromètre, a permis une augmentation significative de la vitesse de dissolution de principes actifs peu solubles [19], rendant probablement leur incorporation dans une forme à action prolongée plus avantageuse. Dans d'autres cas, à cause d'une vitesse de dissolution très élevée, les

médicaments très solubles dans l'eau peuvent être difficiles à contrôler et/ou prolonger leur vitesse de libération, à partir de formes à action prolongée.

I.6.3 Coefficient de partage

En général, les médicaments à très haut coefficient de partage (c.à.d, très liposolubles) vont pénétrer facilement les membranes du corps produisant une accumulation dans les tissus, suivie d'une élimination lente. Une autre possibilité est que le PA reste localisé dans la phase lipidique du tissu, puisqu'il doit traverser des barrières huileuses et aqueuses lors de son passage à travers les tissus. Dans les deux cas, un système à libération contrôlée paraît peu utile pour ce type de PA. Par exemple, les phénothiazines sont une classe de PA caractérisés par de très hauts coefficients de partage, ont tendance à persister dans le corps pour une longue période de temps [20].

I.6.4 Temps de demi-vie biologique ($t_{1/2}$)

Le temps de demi-vie, et par conséquent la durée d'action d'un médicament jouent un rôle majeur lors de la considération d'un PA comme candidat pour la libération contrôlée. Les facteurs influençant le temps de demi-vie d'un PA incluent son profil d'élimination, de métabolisme et de distribution. La majorité des médicaments ont une demi-vie d'excrétion variant entre 1 et 20 heures. Les formes à libération prolongée paraissent très désirables comparées aux formes conventionnelles à libération immédiate, pour l'administration de PA à court temps de demi-vie, puisqu'ils permettent un dosage moins fréquent. Cependant, pour un médicament à très court $t_{1/2}$, la vitesse de libération nécessaire, pour maintenir des taux plasmatiques relativement constants, va être plus élevée. Si le seuil thérapeutique et la durée prévue de libération sont assez élevés, la taille de la forme à libération contrôlée, requise pour incorporer cette dose, sera trop grande [18].

D'autre part, il existe peu de raisons pour préparer des formulations à libération contrôlée pour des PA à longs temps de demi-vie biologique, puisqu'il existe peu ou aucun avantage thérapeutique pour ces produits, par rapport aux comprimés ou capsules conventionnels. Un exemple de tels médicaments, est la phénylbutazone qui à cause d'une complexation importante du PA aux protéines, a un taux de métabolisation relativement lent, qui donne un $t_{1/2}$ d'environ 72 heures.

I.7 Aspect fondamental de la libération contrôlée

I.7.1 Les polymères dans les systèmes à libération contrôlée

Pour la réalisation de formes pharmaceutiques à libération contrôlée, on fait appel dans la majorité des cas à des matériaux de nature polymérique. Ces composés sont synthétiques, semi-synthétiques ou naturels. Le rôle joué par le polymère varie en fonction du mécanisme de libération et de la forme médicamenteuse.

Pour convenir à la réalisation d'une forme à libération contrôlée, le polymère doit répondre aux trois exigences générales suivantes:

- a) Il doit présenter certaines caractéristiques de libération du PA en relation avec les propriétés physico-chimiques de ce dernier et les exigences pharmacocinétiques ;
- b) Il doit posséder une résistance mécanique suffisante pour permettre l'administration de la forme médicamenteuse et le maintien de son intégrité au cours du traitement ;
- c) Il doit être compatible avec les muqueuses et les tissus récepteurs.

I.7.2 Principes du transport à travers un réseau polymérique

Une membrane peut être définie comme une interphase qui limite le transport de différentes substances entre les phases. L'absorption correspond à la pénétration d'une molécule dans l'épaisseur de la paroi polymérique. Le mouvement des molécules au sein de la matrice polymérique est appelé diffusion. Pour la plupart des PA, destinés à la libération contrôlée, leur vitesse de diffusion au sein du système représente l'étape limitante de la mise à disposition. En fonction de la nature ou de la structure du PA et du substrat, cette diffusion a lieu dans le matériau polymérique même ou dans le liquide imbibant les pores, dans le cas d'un support inerte poreux. La vitesse et l'importance de la diffusion sont déterminées par le coefficient de partage polymère-milieu externe (état d'équilibre) et le coefficient de diffusion (cinétique de pénétration) du PA dans le polymère [21].

I.7.2.1 Principe général du phénomène de transport

Le phénomène de diffusion moléculaire peut être défini comme un processus de transfert de masse de molécules d'un soluté, sous l'effet du mouvement engendré, par l'existence d'un gradient de concentration [21]. Le transport de matières par diffusion à travers une barrière a été quantifié par Fick dès 1855. La première loi s'applique à la diffusion unidirectionnelle en régime constant ou stationnaire ("steady state"), et elle s'exprime par:

$$J = \frac{dM_t}{Sdt} = -D_p \frac{dC}{dx} \dots\dots\dots [6]$$

Où:

J: représente le flux de matière diffusante (mole/cm².s ou g/cm².s), c'est-à-dire la vitesse de transfert d'une masse de soluté (dM/dt) à travers une barrière d'une unité de surface,

D_p: est le coefficient de diffusion (cm²/s), qui est une mesure de la mobilité des molécules individuelles dans la membrane,

C: est la concentration du soluté (g/cm³ ou mole/cm³),

x: correspond à la distance de diffusion.

Le signe négatif signifie que le vecteur flux J a un sens opposé au vecteur gradient de concentration dC/dx.

I.7.2.1.1 Coefficient de diffusion de molécules dans les polymères

La diffusivité ou le coefficient de diffusion est un facteur inhérent à une substance, pour une température et un milieu donnés. Le coefficient de diffusion dans les liquides est peu influencé par la masse moléculaire de la substance, et peut être évalué à partir de l'équation de **Stokes Einstein** qui relie D à la viscosité de la solution η.

$$D = \frac{kT}{6\Pi\eta a} \dots\dots\dots [7]$$

Où:

a: est le rayon hydrodynamique effectif de la particule sphérique,

T: est la température (K),

et k est la constante de Boltzmann.

Dans un réseau polymérique, la taille moléculaire a une influence beaucoup plus marquée sur la diffusivité de la particule, et son effet varie en fonction du type de polymère. En fait, une mobilité des chaînes macromoléculaires est nécessaire, pour permettre le passage d'une molécule à travers un réseau polymérique. Un nombre plus élevé de segments de chaînes doit se réorienter, pour permettre le passage de molécules de rayon hydrodynamique élevé par rapport aux molécules de faible taille.

I.7.2.1.2 Relation entre structure polymérique et mécanisme de diffusion

Il existe trois mécanismes qui peuvent être considérés, pour expliquer le relargage d'une molécule dans un réseau polymérique. Ils sont fortement dépendants de la nature du principe actif et

plus particulièrement de propriétés structurales du polymère tel que son taux de gonflement, la vitesse de gélification et son comportement dans le fluide physiologique. Ces mécanismes selon **Jalil R [22]** sont comme suit :

1. Diffusion fickienne: La diffusion du principe actif a eu lieu par solubilisation (ou de partage) de la molécule, dans le polymère suivie par sa diffusion le long et entre les chaînes macromoléculaires du polymère.

2. Diffusion non fickienne: Dans ce cas le principe actif passe à travers les pores remplis d'eau, celle-ci formées lors du gonflement du polymère, à ce niveau le principe actif s'hydrate avant même de diffuser au milieu environnant. Ce mécanisme est appelé aussi diffusion par transport (cas II) qui fait référence à l'état de relaxation-gonflement du polymère.

3. Relargage du principe actif par érosion du polymère.

Il est possible également que le relargage du principe actif soit moduler par les trois mécanismes.

La prédominance de l'un des deux mécanismes de diffusion, dépend de la morphologie du système et des caractéristiques du polymère et de la substance diffusante.

Dans les systèmes polymériques macroporeux, dont la taille moyenne des pores est assez élevée (> 50 nm), le transport du soluté se fait majoritairement dans le liquide remplissant les pores. Ce type de pores est présent par exemple dans les matrices inertes classiques à libération prolongée, préparées par compression et dans d'autres matrices où le soluté est très peu soluble, ainsi que dans les enrobages classiques insolubles (par exemple: éthylcellulose). Bien qu'on puisse observer une diffusion, le transport par convection reste le mécanisme de libération ou de passage des PA le plus important. Le processus est en grande majorité contrôlé par la taille et la distribution du réseau poreux ainsi que par la tortuosité du trajet à effectuer par la molécule.

D'autre part, dans les systèmes mésoporeux (2 nm $<$ diamètre moyen des pores $<$ 50 nm) ou microporeux (diamètre moyen des pores $<$ 2 nm), la diffusion se fait essentiellement dans l'espace inclus entre les chaînes polymériques. Cette diffusion est affectée par les interactions thermodynamiques soluté-polymère (définies par le coefficient de partage K), par la structure (ramification, longueur moyenne des chaînes, réticulation, état vitreux ou caoutchouteux ...) et la nature (hydrophile, hydrophobe ou amphiphile) du polymère. Deux types de systèmes peuvent être distingués:

- a) Les systèmes hydratés où la diffusion a lieu soit dans le liquide interstitiel, soit dans la trame polymérique, en fonction de la lipophilie du soluté.
- b) Les systèmes hydrophobes dans lesquels le soluté doit se solubiliser pour pouvoir diffuser.

Un modèle théorique purement empirique a été proposé par **Peppas et al [23]**, celui-ci donne les différents mécanismes du relargage du principe actif en fonction du temps. Cette expression décrit la cinétique de relargage pour une fraction libérée de principe actif <60%. Ce modèle est proposé dans le but de déterminer la loi qui régit la cinétique de relargage dominante quand ce dernier est modulé par les différents mécanismes cités auparavant :

$$f(t) = \frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \dots\dots\dots [8]$$

Où $f(t)$: Fraction du principe actif libéré en fonction du temps,

k : Constante décrivant les propriétés structurales et géométriques des microparticules du polymère,

n : Exposant décrivant le mécanisme de relargage qui peut être fickien ou non fickien,

t : Temps de relargage du principe actif.

I.7.2.1.3 Coefficient de partage

L'affinité relative du soluté pour la phase polymérique et la phase liquide, peut avoir un effet significatif sur la cinétique de libération. Cette solubilité relative du principe actif dans chaque phase peut être définie par:

$$K = \frac{C_s}{C_l} \dots\dots\dots [9]$$

Où K est le coefficient de partage reliant la quantité de soluté dans la phase solide à la quantité de soluté dans la phase liquide; C_s et C_l correspondent respectivement à la concentration à l'équilibre du soluté dans le polymère et dans la phase liquide.

Le coefficient de partage K peut être lié aux paramètres thermodynamiques du phénomène de partage par la relation:

$$\log K = \frac{-\Delta H^\circ}{2,303RT} + \frac{\Delta S^\circ}{2,303R} \dots\dots\dots [10]$$

Où ΔH° et ΔS° sont les variations d'enthalpie et d'entropie au cours du processus de transfert.

I.7.2.1.4 Diffusion dans les polymères hydratés

La diffusion de substances dans un gel hydraté, à ponts inter macromoléculaires physiques et/ou chimiques, peut être expliquée par la théorie du "volume libre". Cette théorie est basée sur la

probabilité qu'une molécule trouve localement assez d'espace pour diffuser entre les segments des chaînes macromoléculaires. Cette probabilité augmente avec une diminution de la taille de particule.

D'autre part, la théorie du "volume libre" prévoit aussi un facteur de distribution dimensionnelle des trous qui agissent comme des tamis face à la diffusion de substances à taille de particule assez élevée [21].

La diffusion se fait à l'intérieur de pores fluctuants, qui se créent constamment par la redistribution du volume libre du gel polymérique, qui est considéré homogène au niveau macroscopique. Si on considère que cette diffusion a besoin d'énergie pour être activée et qu'au fur et à mesure, le soluté et les chaînes de polymères qui l'entourent acquièrent assez d'énergie, appelée énergie d'activation, les molécules se déplaceront à une série successive de positions d'équilibre [8]. Ainsi, on s'attend à ce qu'une variation de température affecte la cinétique de diffusion d'un soluté à travers un réseau polymérique. Ce processus de diffusion, dépendant de l'énergie, peut être représenté par la relation d'Arrhenius [8]:

$$D_p = D_0 e^{-E_d/RT} \dots\dots\dots [11]$$

Où D_p : Coefficient de diffusion du soluté dans le réseau polymérique,

D_0 : Facteur indépendant de la température ayant la même unité que D_p ,

E_d : Energie d'activation pour la diffusion dans les polymères,

R : Constante des gaz parfaits,

T : Température en degré kelvin.

I.7.3 Matrices hydrophiles à base de polysaccharides pour libération prolongée de médicaments

Parmi les polymères hydrophiles on distingue les polysaccharides qui sont très populaires dans la formulation de formes pharmaceutiques pour la libération prolongée de médicaments. Parmi cette large gamme de polymères naturels ou semi-synthétiques, on trouve:

A. Les éthers de cellulose

L'excipient le plus étudié est l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC). La HPMC est un polymère hydrophile non-ionique préparé par traitement de la cellulose provenant de la pulpe de bois ou des fibres de Cotton avec des produits alcalins et avec de l'oxyde de propylène. Le nombre de substituant par unité est connu par le degré de substitution (D.S.). Le nombre de substituants

détermine les propriétés des différents produits de HPMC. La viscosité du polymère est utilisée comme indication de sa masse moléculaire, et une augmentation de la viscosité du polymère dans une formulation matricielle augmente la viscosité de la couche gélifiée.

L'avantage essentiel de formulations hydrophiles basées sur l'HPMC est l'indépendance de la libération du PA de variables telles que la force de compression, la taille des particules du PA et la nature des lubrifiants utilisés dans la compression. Alors que la force de compression a peu d'effet sur la vitesse totale de libération du médicament, elle peut influencer le stade initial d'hydratation de systèmes à base de HPMC. L'augmentation de la porosité engendre une augmentation de la vitesse de pénétration d'eau, mais affecte peu la vitesse de gonflement et d'érosion des matrices.

La libération d'un PA soluble à partir de tels systèmes est contrôlée en général par l'érosion de la couche externe gélifiée ainsi que par la diffusion du PA dans la matrice hydratée. La formation d'une couche externe gélifiée au contact du milieu aqueux est un aspect essentiel pour ralentir la vitesse de libération de PA incorporés dans des matrices de HPMC. Dans le cas de PA solubles, la diffusion est le mécanisme essentiel de libération. Dans certains cas où le PA est peu soluble, et en fonction du type de polymère, la vitesse de dissolution du PA peut agir comme étape limitante, et des profils de libération quasi-linéaires sont souvent obtenus.

Alors que la libération de PA est uniquement influencée par de l'HPMC à haut poids moléculaire la solubilité du PA peut significativement influencer les propriétés de gélification de matrices d'HPMC. Une augmentation de la solubilité du PA cause une augmentation de l'épaisseur de la couche gélifiée et un raccourcissement de la durée de libération complète [24].

Les applications de l'HPMC dans la libération contrôlée de médicaments pharmaceutiques sont très variées. Parmi ces applications, les différents grades d'HPMC sont largement utilisés dans la formulation de systèmes matriciels simples ou à multicouches (Geomatrix™) préparés par compression ou par enrobage par évaporation de solvant [10].

B. Les amidons thermiquement modifiés

Le faible coût de ces produits a suscité un intérêt pour leur utilisation comme excipients pour matrices hydrophiles. Les amidons thermiquement modifiés sont généralement préparés à partir d'amidons, contenant de 0 à 75 % d'amylose, par gélatinisation directement suivie par un procédé de déshydratation thermique.

Une nouvelle génération de systèmes à libération contrôlée de médicaments, activée par le solvant, à base d'amidons pré-gélatinisés a été introduite par **Te Wierik et al** [25]. Le produit, préparé par dégradation enzymatique suivie par la précipitation de l'amidon de pomme de terre, a une large

surface spécifique et une bonne compressibilité. Des profils de libération constants de théophylline ont été réalisés même pour des taux d'incorporation de PA relativement élevés (jusqu'à 75%). La force de compression, la géométrie du comprimé, les taux d'incorporation de PA ainsi que la présence d'excipients solubles influencent les profils de libération de PA (tels que l'acétaminophène, la théophylline et l'hydrochlorure de procaine) à partir de ces systèmes.

C. *Le chitosane*

Le chitosane est un polysaccharide cationique naturel. Il a été démontré qu'il agit effectivement comme matrice hydrophile pour libération prolongée en milieu acide. Cependant, dans l'eau ou dans le jus intestinal simulé, les matrices de chitosane se désintègrent, causant une libération rapide de médicament.

Les propriétés de solubilité du chitosane dépendent du pH et sont dues à la présence de groupements amines libres dans le polymère. L'inclusion d'un faible pourcentage d'acide citrique a permis une libération soutenue quelles que soient les conditions du milieu et pour un faible taux de chitosane (moins de 50 %) [26]. D'autre part, des hydrogels lyophilisés à base de chitosane-poly (oxyde d'éthylène) ont été conçus comme systèmes gonflables pH-dépendants pour la libération localisée de médicaments au niveau de l'estomac. Ces systèmes, synthétisés par réticulation du chitosane avec du poly (oxyde d'éthylène), gonflent environ dix fois plus dans le milieu gastrique acide (pH 1.2) que dans le fluide intestinal (pH 7.2) [10].

D. *La gomme xanthane*

La gomme xanthane est largement utilisée comme agent épaississant dans l'alimentation et a été nouvellement ajoutée à la liste des systèmes matriciels hydrophiles. La gomme xanthane montre une dépendance assez significative à la vitesse d'agitation dans le test de dissolution *in vitro*. D'autre part, la libération de PA à partir de matrices hydrophiles de xanthane est aussi influencée par la force ionique du milieu. L'interaction de la gomme xanthane avec les gommages galactomannanes est aussi connue depuis plusieurs années. Cette combinaison est utilisée pour préparer des matrices hydrophiles pour une libération contrôlée par voie orale [10].

E. La gomme Guar

La gomme Guar est un galactomannane composé d'un galactose sur chaque unité de mannose, avec un rapport d'environ 2: 1 (mannose:galactose). Étant un produit naturel, la gomme Guar peut contenir, en plus du galactomannane (environ 80 %), une variété d'impuretés, y compris de l'eau (12 %) et des protéines (5 %). La gomme Guar s'hydrate et gonfle rapidement dans de l'eau froide formant une dispersion colloïdale visqueuse. La masse moléculaire de la gomme Guar serait d'environ 1 à 2 millions.

Dans le domaine pharmaceutique, la gomme Guar est utilisée comme agent liant et délitant dans les comprimés, comme agent viscosifiant, ainsi que comme adjuvant pour la libération contrôlée de médicaments. La formation d'une couche gélifiée externe permet le prolongement de la durée de libération de PA à partir de matrices de gomme Guar. La couche gélifiée n'est pas, cependant, aussi épaisse que celle d'autres polymères hydrophiles, tels que l'hydroxypropylcellulose. Les propriétés de gélification des matrices de gomme Guar sont affectées par la force ionique, la force de compression, le degré de branchement et le rapport polymère:PA [10].

F. L'amylose réticulé

L'amylose est un matériau polymérique ayant des applications très variées. Il représente la partie non ramifiée de l'amidon avec une masse moléculaire entre 100 000 et 500 000 Daltons. Il est formé d'unités de α -D-glucopyranose jointes les unes aux autres par des liaisons 1 \rightarrow 4.

Par précipitation sélective de l'amylose à partir de solutions ou de suspensions aqueuses d'amidon, il est possible d'obtenir de l'amylose purifié.

L'amylose réticulé a été introduit au début des années 90 sous le nom de Contramid® comme matrice polymérique hydrophile pour la libération contrôlée de médicaments.

Le polymère est obtenu par la réticulation de l'amidon à haute teneur en amylose (environ 70 % d'amylose p/p) avec des agents de réticulation, tels que l'épichlorhydrine et le trimétaphosphate trisodique pour former une structure tridimensionnelle. D'autre part, l'AR est un polymère semi-synthétique biodégradable; l' α -amylase reconnaissant l'AR comme substrat est capable d'hydrolyser les liaisons α -1,4. Ainsi, en incorporant l' α -amylase au sein de matrices d'AR, il est possible de moduler le profil de libération de PA.

Les comprimés d'amylose réticulé préparés par compression directe sont à l'état vitreux. Au contact du milieu aqueux, les matrices gonflent significativement et libèrent le PA graduellement en fonction du temps. La Libération peut se produire sur une longue durée de temps (jusqu'à 24 h). Il a

été observé que le temps de libération d'un PA diminuait avec le degré de réticulation des granules d'amylose réticulé utilisés dans la préparation de la matrice hydrophile. En plus de son utilisation comme matrice pour la libération contrôlée de médicaments, amylose réticulé a été introduit comme agent liant et aussi délitant [10].

I.8 Différents systèmes à libération prolongée et leurs mécanismes de relargage

Les mécanismes de contrôle de libération les plus communs agissant dans les systèmes polymériques regroupent un ou plusieurs des principes suivants:

- Systèmes contrôlés par la diffusion.
- Systèmes osmotiques.
- Systèmes biodégradables.

I.8.1 Systèmes contrôlés par la diffusion

Le contrôle de la diffusion d'un principe actif à partir de tels systèmes est assuré, soit par un support polymérique dans lequel le PA est dispersé ou dissous (systèmes matriciels), soit par une barrière polymérique entourant un réservoir de PA (systèmes réservoirs).

I.8.1.1 Systèmes matriciels

On peut distinguer principalement deux catégories de systèmes matriciels:

- Les systèmes matriciels non gonflables. Ils regroupent les matrices homogènes et les systèmes matriciels inertes hétérogènes.
- Les systèmes matriciels gonflables.

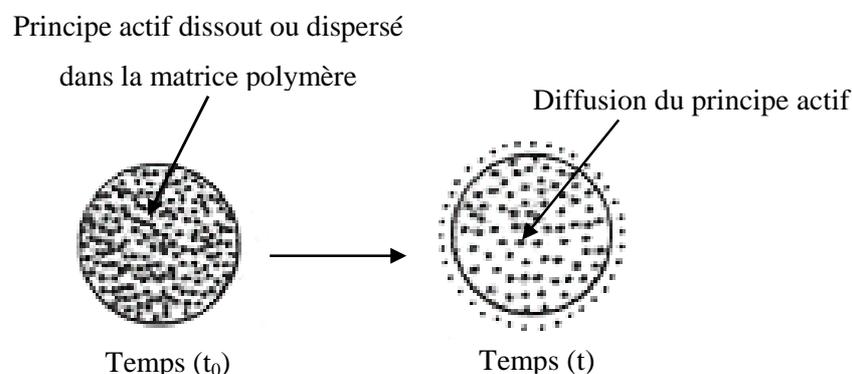


Figure 4: Diffusion du principe actif à travers le système matriciel [9]

I.8.1.1.1 Systèmes matriciels non gonflables

a) Matrices homogènes

Ces systèmes non poreux sont formés d'une phase continue dans laquelle le PA diffuse, à condition qu'il y soit soluble. Un médicament est souvent incorporé dans une matrice homogène en imbibant la matrice par une solution concentrée du principe actif jusqu'à l'atteinte de l'équilibre. Ceci concerne essentiellement les matrices hydrophobes (par exemple, le polydiméthylsiloxane (PDMS) et les gels hydratés tels que les gels de poly(alcool de vinyle) (PVA) [27]. Les hydrogels peuvent être considérés comme matrices homogènes puisqu'ils ne comportent pas de véritables pores de dimensions définies et de géométrie fixe. De plus, une partie de l'eau dans les hydrogels n'est pas à l'état libre.

Dans le cas des PA présentant une grande affinité pour le véhicule polymérique, le coefficient de partage (K) entre la matrice et la couche de diffusion peut jouer un rôle essentiel dans le contrôle de la vitesse de libération (surtout dans le cas des polymères hydrophobes). La diffusion d'un PA dépend aussi de la taille de la molécule diffusante et de la structure polymérique, telle que la dimension des pores ou mailles moléculaires (espaces libres entre les chaînes macromoléculaires du polymère). Le traitement mathématique de la cinétique de libération d'un PA à partir de tels systèmes, où le PA est dissous, est assez rigoureux et complexe. La difficulté primordiale avec les systèmes homogènes avec PA en solution est liée au faible taux d'incorporation en agents thérapeutiques. De plus, les vitesses de libération non constantes ne sont pas valables pour certaines applications [10].

b) Matrices poreuses inertes

Le système consiste en une dispersion d'un PA solide dans une matrice polymérique inerte (par exemple, polyéthylène, éthylcellulose, silicone). Les particules de polymère, imperméables au PA, sont entourées d'un réseau de canalicules. De tels systèmes sont le plus souvent préparés par compression de particules de polymère et de PA. Le processus d'épuisement graduel de la matrice se produit par pénétration par capillarité du fluide environnant à travers la poudre médicamenteuse dispersée dans le support, suivi d'une dissolution directe dans le liquide présent dans le réseau de canalicules entre les particules polymériques, et enfin diffusion du soluté vers l'extérieur soit à travers le réseau poreux, soit à travers les espaces intermoléculaires. De ces trois phénomènes qui ont

lieu de façon concomitante, la diffusion du PA constitue le plus souvent l'étape contrôlant la cinétique de libération (tant que le PA est relativement soluble dans l'eau).

Puisque dans les systèmes inertes poreux la diffusion du PA a lieu majoritairement dans le milieu aqueux baignant les pores, c'est à la solubilité du PA dans l'eau que la concentration d'incorporation doit être, en général, comparée. Dans le cas où, soit la solubilité du PA est restreinte dans le polymère, soit les doses d'incorporation sont élevées, la concentration de soluté est très souvent supérieure à sa concentration de saturation dans le polymère concerné. La libération de PA de ce type de systèmes peut être décrite par le modèle proposé par **Higuchi [28]**. Le modèle suppose que le PA est à l'état solide au temps zéro. Suite au contact avec le milieu aqueux, l'eau pénètre rapidement dans la couche superficielle du système et dissout l'agent solide qui diffuse premièrement du système vers l'extérieur. Quand la couche de surface s'épuise en PA, la couche suivante commence à s'épuiser graduellement. En d'autres termes, le modèle suppose qu'une couche de particules solides ne peut se dissoudre que lorsque la précédente est elle-même éluée. Le modèle suppose aussi que le gradient de concentration entre l'interface (située à une distance x au temps t) et la surface est constant. En d'autres termes, alors que la vitesse de libération est fonction du temps, elle est quand même essentiellement indépendante de la distance x en tout temps.

I.8.1.1.2 Systèmes matriciels gonflables

Dans de tels systèmes, le PA est dissous ou dispersé dans une matrice polymérique hydrophile initialement à l'état vitreux. Au fur et à mesure que l'eau pénètre, le polymère gonfle; on observe alors le passage du polymère à un état caoutchouteux qui permet la diffusion du PA [27]. Le mécanisme de diffusion dépend de l'état thermodynamique du polymère. En fait, le processus de gonflement engendre des contraintes mécaniques surtout dans la zone définie par le passage du polymère de l'état vitreux à l'état caoutchouteux. Au niveau moléculaire, ces contraintes correspondent à un phénomène de relaxation qui a lieu en présence de l'agent pénétrant. Ces relaxations, selon leur vitesse et leur amplitude, peuvent affecter le processus de transport de l'agent pénétrant, et par conséquent le mécanisme de libération du PA. La vitesse et l'amplitude de ces relaxations dépendent entre autres du poids moléculaire du polymère, de son hydrophilie, du degré de réticulation (s'il y a lieu), de la nature des interactions solvant-polymère, de la géométrie de la matrice polymérique et du taux d'incorporation de PA [29].

I.8.1.2 Systèmes réservoirs

Les systèmes réservoirs ou systèmes à membranes consistent en une barrière polymérique qui entoure un réservoir de PA. C'est essentiellement la membrane polymérique qui règle la diffusion du PA vers le milieu externe. Les systèmes réservoirs sont très utilisés dans le domaine pharmaceutique. Les membranes polymériques dans de telles applications incluent une variété de polymères tels que les réseaux de silicone. On distingue deux types de systèmes réservoirs: les systèmes réservoirs à activité constante et les systèmes réservoirs à activité non constante.

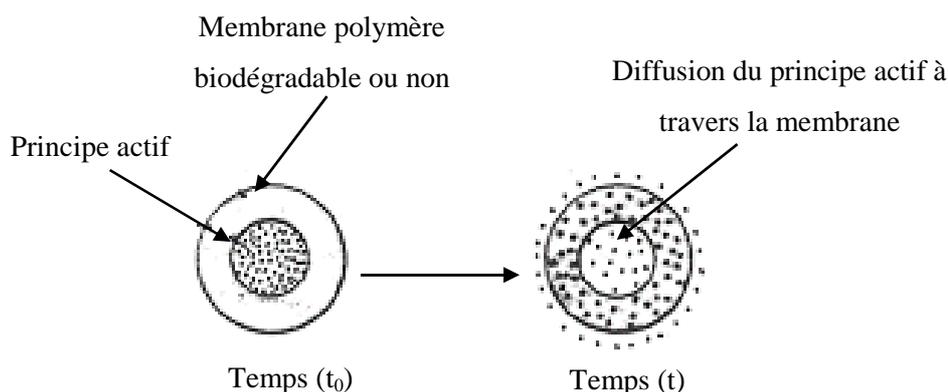


Figure 5: Diffusion du principe actif à travers le système réservoir [9]

I.8.1.2.1 Systèmes réservoirs à activité constante

Ces systèmes réservoirs ont l'avantage de donner une vitesse constante de libération durant une longue durée de temps. Ces systèmes sont conçus pour contenir une solution saturée en PA ainsi qu'un excès substantiel de solide non dissous qui permet de garder la saturation pendant une durée de temps bien déterminée. En pratique, le réservoir est constitué soit d'une suspension du PA dans de l'eau, de l'huile ou tout autre liquide, soit de la poudre sèche. Les réservoirs à contenu liquide ont l'avantage de faciliter le contact du PA avec la surface interne de la membrane polymérique par comparaison avec les noyaux solides. Cependant, les transporteurs liquides de masse moléculaire relativement faible pourraient diffuser à travers la membrane en compagnie du PA. D'autre part, le PA pourrait précipiter dans le transporteur liquide [8]. Le gradient de concentration de la matière diffusante à travers une membrane polymérique qui constitue la force motrice de la diffusion demeure constant tant que l'activité du PA est en équilibre avec la surface interne de cette membrane. Par conséquent, si l'activité thermodynamique du soluté est gardée constante dans le noyau, on s'attend à une libération linéaire de PA.

I.8.1.2.2 Systèmes réservoirs à activité non constante

Même dans le cas où l'activité thermodynamique du soluté était initialement constante, la perte progressive de PA ou la dilution par l'eau cause une chute exponentielle de la vitesse de libération en fonction du temps. On s'attend alors à une libération de PA de premier ordre [30].

I.8.2 Systèmes osmotiques (pompe osmotique)

Ces systèmes utilisent la pression comme source d'énergie pour la libération contrôlée de PA. Dans le cas le plus simple, un système réservoir est constitué d'un noyau solide comportant le PA souvent mélangé à un agent osmotique (NaCl ou KCl). Une membrane polymérique semi-perméable entourant le noyau permet une diffusion sélective de l'eau vers l'intérieur du système par simple appel osmotique. Cet apport d'eau augmente la pression dans le compartiment interne, entraînant alors la libération d'un volume égal de solution saturée de PA par un ou plusieurs orifices (percés au laser) connectant le compartiment interne au milieu externe. La vitesse de libération est influencée par les propriétés osmotiques du noyau, la surface et l'épaisseur de la membrane ainsi que sa perméabilité à l'eau [31].

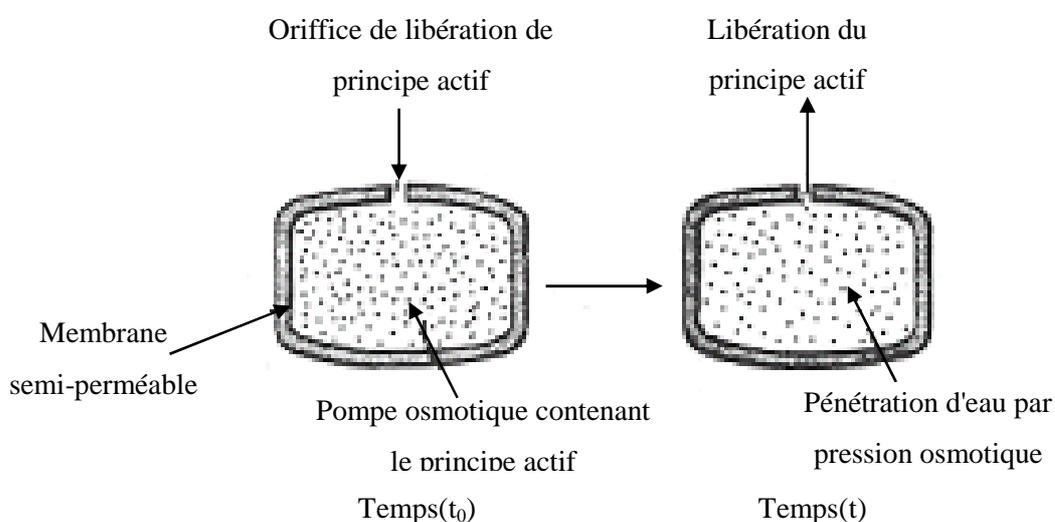


Figure 6: Libération de principe actif par système à pression osmotique [9]

I.8.3 Systèmes biodégradables

Les systèmes biodégradables utilisent le plus souvent une technologie matricielle, mais il existe aussi des systèmes réservoirs biodégradables comme les microcapsules, par exemple. Dans le cas de matrices biodégradables, l'érosion a lieu au cours du temps, libérant au fur et à mesure le PA

incorporé [32]. Dans le cas des systèmes réservoirs, la membrane polymérique peut se dégrader avant ou après la libération complète du PA du réservoir. A titre d'exemple, une variété de polymères polysaccharidiques tels que le dextran et les dérivés d'amidon sont utilisés comme films protecteurs dégradables par les enzymes, pour libération de médicaments activée au niveau du colon.

Le processus de dégradation peut se produire de plusieurs façons selon le type de polymère utilisé. Dans le cas de polymères hydrophiles rendus insolubles par réticulation, la dégradation se produit, souvent, par une rupture des ponts de réticulation dégradables. En général, un tel mécanisme de dégradation contrôle la libération de PA incorporé dans des hydrogels préparés par copolymérisation de N-vinylpyrrolidone ou acrylamide avec N,N-méthylènebisacrylamide [12]. L'hydrogel se dégrade lentement par hydrolyse du groupement méthylène dans le pont de réticulation. Dans le cas de polymères insolubles dans l'eau, la dégradation peut se produire par clivage enzymatique ou hydrolytique de chaînes de faible poids moléculaire, ou par ionisation ou protonation de certains groupements latéraux.

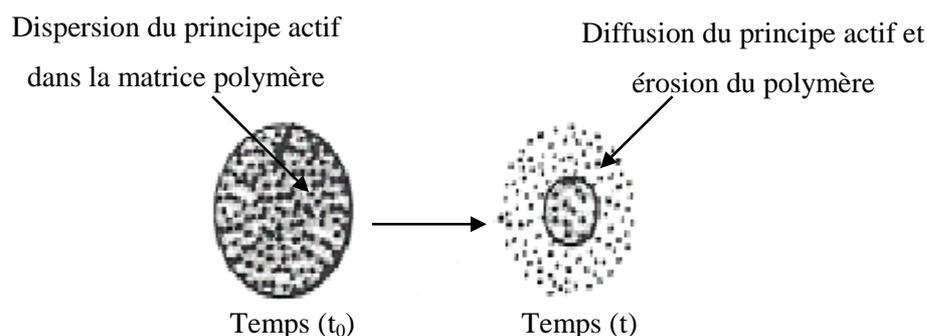


Figure 7: Diffusion du principe actif à travers le système réservoir (membrane) [9]

Une libération d'ordre zéro peut théoriquement être atteinte à partir de systèmes biodégradables si la géométrie de la matrice est telle que la surface d'érosion reste quasiment constante dans le temps et si la dissolution est une fonction linéaire de la surface (érosion hétérogène, polymères hydrophobes). Les polymères, tels que l'acide poly lactique, l'acide polyglycolique et leurs copolymères s'érodent par hydrolyse des fonctions esters pour former des molécules solubles à faible poids moléculaire. D'autre part, les dérivés de l'acétate de cellulose se solubilisent dans l'eau par ionisation de groupements carboxyliques latéraux. Une situation dans laquelle l'érosion est le processus limitant de la libération reste assez difficile à obtenir en pratique. Souvent l'érosion survient par fragments successifs non constants et n'est pas limitée à la surface de la matrice (érosion homogène). De plus, la diffusion du PA se rajoute fréquemment au processus d'érosion, rendant ainsi difficile la modélisation de la libération de PA à partir de tels systèmes [4].

CHAPITRE II: LE CHITOSANE

II. Historique et découverte de la chitine et du chitosane

En 1811, le Professeur Henri Braconnot, directeur du jardin biologique à Nancy (France) a 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) et a été ensuite nommée chitine (provient du mot grec "kitos" qui signifie l'enveloppe). En 1859, le Professeur C. Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin et a observé les différentes solubilités de la chitine. La substance, résultat du traitement alcalin, a pu être dissoute dans les acides. Cependant, seulement en 1894 cette substance a été nommée chitosane par Hoppe-Seyler [33].

Entre 1930 et 1940, ces biopolymères ont suscité beaucoup d'intérêt dans le monde oriental, principalement pour l'application dans le domaine médical et la purification de l'eau. Aujourd'hui, nous savons que la chitine et le chitosane sont biodégradables et biorésorbables. Ces deux propriétés sont primordiales à notre époque où la protection de l'environnement joue un rôle important. Ils se trouvent abondamment dans la nature et sont des ressources renouvelables. La production annuelle de chitine dans la nature est estimée à 10^9 - 10^{10} tonnes et actuellement elle n'est pas très exploitée et commercialisée par rapport à la cellulose [34].

II.1 La chitine

La chitine est le polysaccharide naturel largement répandu dans la nature. 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. Il est à noter que la carapace des krills des mers du nord représente à elle seule une source potentielle de chitine. La chitine associée à des protéines contribue à la cohésion des différentes couches qui constituent la coquille des mollusques ou la carapace des arthropodes.

Dans le règne végétal, la chitine se trouve dans la paroi de la plupart des champignons et de certaines algues chlorophycées. En plus de son rôle dans le maintien de la rigidité de la cellule, elle contribue au contrôle de la pression osmotique. La chitine est présente aussi dans certaines levures et bactéries. Bien que les sources potentielles de chitine soient très nombreuses (tableau 2).

Tableau 2: Sources potentielles de chitine [35].

<i>Sources de chitine</i>	<i>Teneur en chitine (%)</i>
Bernacle (<i>Lepas anatifera</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
Calmar (<i>Loligo vulgaris</i>)	40

II.1.1 Cristallographie de la chitine

La chitine est fortement cristalline possédant des chaînes bien ordonnées et selon la source d'extraction elle se trouve sous trois formes α -, β - et γ -chitine. α -chitine est extraite des carapaces des crevettes, des crabes, des homards et dans les carapaces des crustacés bivalves tels que les palourdes et les huîtres. La β -chitine se trouve dans les colonnes vertébrales des céphalopodes tels que les calmars et les seiches [36]. Les analyses de la forme polymorphique γ de la chitine ont révélé que celle-ci rejoint la famille α (alpha).

Et ces différentes formes liées à la chitine peuvent être distinguées les unes des autres par différentes techniques d'analyses à savoir la spectroscopie IR, la DRX et l'RMN en phase liquide. Ces formes diffèrent dans leurs arrangements de chaînes dans les régions cristallines comme c'est présenté sur la figure 8.

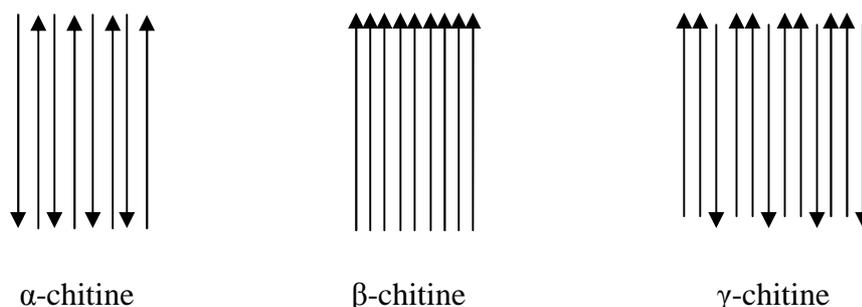


Figure 8: Arrangement des chaînes du polymère dans les trois formes de la chitine [37]

Les trois types différents aussi dans leurs degrés d'hydratation la dimension de la maille (tableau 3) et le nombre de chaînes par maille. α -chitine est la forme la plus cristalline qui a une structure compacte où on retrouve deux chaînes arrangées dans un mode antiparallèle dans une maille, et une seule chaîne par maille qui suit un arrangement dans un mode parallèle dans la β -chitine et dans γ -chitine deux chaînes sont parallèles à la troisième qui se trouve dans un sens opposé.

Tableau 3: Paramètres cristallographiques des différentes formes de la chitine

	$a(\text{Å})$	$b(\text{Å})$	$c(\text{Å})$	$\gamma(^{\circ})$
α -chitine	4.74	18.86	10.32	90
β -chitine	4.85	9.26	10.38	97.5

Les structures présentées en α - et β -chitine ci-dessous montrent l'existence de ponts hydrogène inter chaînes entre les groupements $-\text{C}=\text{O}$ et $\text{N}-\text{H}$ qui maintiennent la distance à 0.47nm le long du paramètre 'a' de la maille. Et sur chaque chaîne on trouve des ponts hydrogènes formés d'une part entre le groupement carbonyle $-\text{C}=\text{O}$ et le groupe hydroxyle $-\text{OH}$ lié au C6 et d'autre part un pont formé entre le groupe hydroxyle $-\text{OH}$ lié au C3 et l'oxygène du cycle.

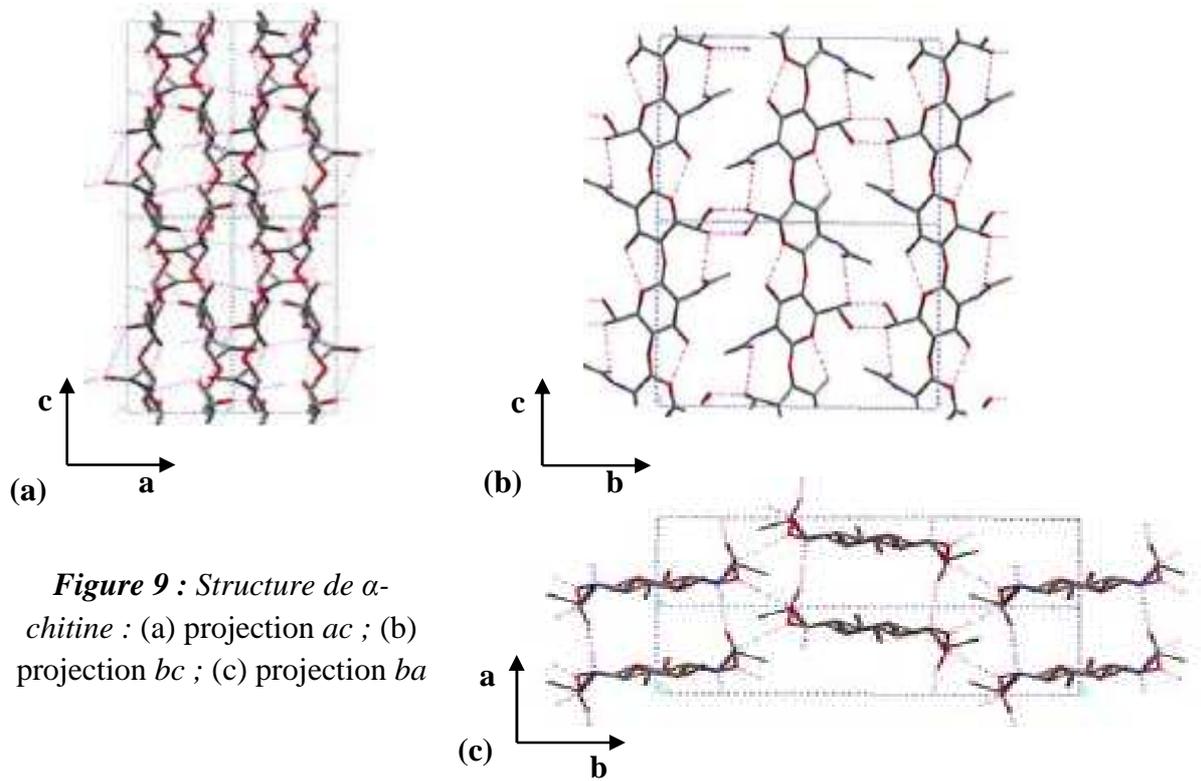


Figure 9 : Structure de α -chitine : (a) projection ac ; (b) projection bc ; (c) projection ba

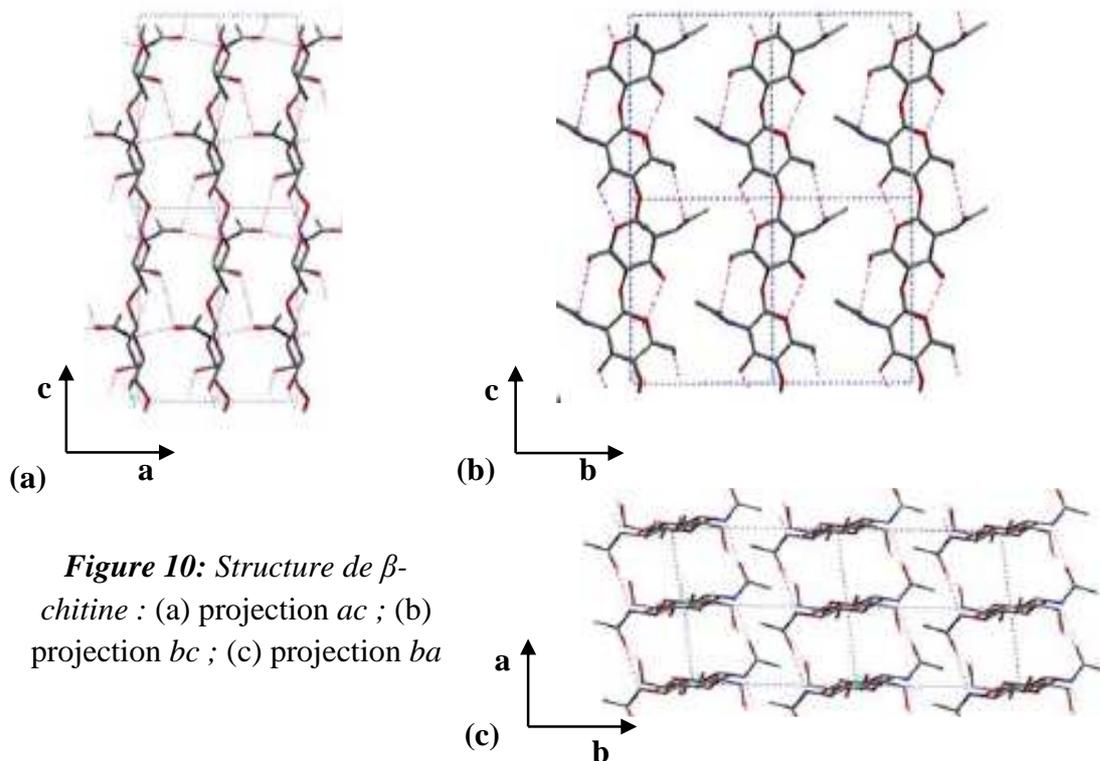


Figure 10: Structure de β -chitine : (a) projection ac ; (b) projection bc ; (c) projection ba

Dans la structure de α -chitine on retrouve des ponts hydrogènes le long du paramètre 'b' entre deux groupes hydroxyméthyle de deux chaînes adjacentes, chose que nous ne rencontrons pas dans la structure de β -chitine ce qui confère à cette dernière un taux de gonflement plus important [38].

II.1.2 Extraction de la chitine

De nombreuses méthodes ont été développées afin de préparer la chitine à partir des exosquelettes. De manière générale, elles consistent à éliminer les éléments minéraux (démminéralisation), les protéines (déprotéinisation) et la couleur (blanchiment).

II.1.2.1 Démminéralisation

La démminéralisation est généralement réalisée par un traitement acide sous agitation pour solubiliser le carbonate de calcium et le chlorure de calcium. Les acides les plus fréquemment utilisés sont l'acide chlorhydrique et l'acide formique à des concentrations de 1 à 10 mol/l. La durée du traitement acide est de l'ordre de 1 à 48 heures à la température ambiante. **Peter M.O-O et al [39]** ont rapporté que la proportion du solide à la solution acide est de 1 :20 (w/v).

Pendant le processus de démminéralisation, des mousses indésirables peuvent se former dues à la production de dioxyde de carbone suivant la réaction ci-dessous :



Des études récentes de **Percot A et al [40]** ont montré que la démminéralisation pouvait être effectuée en 15 minutes à la température ambiante, avec un excès d'acide chlorhydrique 0,25 mol/l et la déprotéinisation réalisée avec une solution de NaOH 1 mol/l pendant 24 heures à 70°C.

Une autre étude réalisée par **Mahlous et ses collaborateurs [41]** montre que la démminéralisation est effectuée au bout de 3 heures avec une solution d'acide chlorhydrique 1N à la température ambiante après exposition de la masse exosquelette à des radiations gamma (γ) du cobalt avec une dose de 25 KGy/min.

II.1.2.2 Déprotéinisation

À l'état naturel, la chitine se présente en association avec les protéines (Chitinoprotéine). Les protéines sont éliminées par un traitement basique en utilisant, en général, des solutions à base de NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, Na₂SO₃, CaSO₃, ou Na₃PO₄, de concentrations

de 0,1 à 5 mol/l. La solution d'hydroxyde de sodium (~10 % massique) est la plus souvent utilisée pour dissoudre les protéines. La durée du traitement basique est de l'ordre de 0,5 à 72 heures à hautes températures (65-140°C). **No et Meyers [42]** ont rapporté que la proportion du solide à la solution alcaline allant de 1:10 à 1:20 (w/v) est recommandée pour que l'élimination des protéines soit efficace.

Mahlous et ses collaborateurs [41] ont rapportés que le traitement de la masse exosquelette par des radiations gamma (γ) du cobalt avec une dose de 25 KGy/min réduit la durée de l'étape de déprotéinisation d'un facteur de 3 avec une solution de NaOH à 1N et à 85°C comparé à une masse non irradiée.

Pendant le processus de déprotéinisation, la formation de mousse peut se produire mais la mousse n'est pas intense comme celle du processus de déminéralisation. **Shahidi et Synowiecki [43]** ont suggéré que la déprotéinisation est optimale en utilisant une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium dont le pH doit être plus bas que le point isoélectrique des protéines pour qu'elles précipitent.

II.1.2.3 Blanchiment

Pour les applications industrielles, la chitine obtenue à partir des ressources crustacées doit être décolorée après les traitements acide et alcalin **[44]**. Le pigment dans les carapaces de crustacées forme un complexe avec la chitine. **Fox [45]** a détecté un dérivé de β -carotène solidement relié à la chitine de l'exosquelette des crabes rouges. Le blanchiment est souvent réalisé par un traitement avec des agents oxydants (KMnO_4 , NaClO , SO_2 , NaHSO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ou H_2O_2). Ce traitement peut éliminer des traces de pigments résiduels, comme les caroténoïdes.

Durant le processus de blanchiment, le réactif utilisé ne doit pas avoir un effet sur les propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane. **No et al [44]** ont pu fabriquer la chitine quasiment blanche par l'extraction avec l'acétone et le séchage pendant 2 heures à la température ambiante, suivi par le blanchiment en utilisant une solution 0,315% d'hypochlorite de sodium pendant 5 minutes avec un rapport du solide au solvant (1:10, w/v). Sans l'extraction préalable par l'acétone, le blanchiment doit être effectué plus de 1 heure pour aboutir à un produit blanc acceptable commercialement. Du fait de sa forte cristallinité, la chitine n'est soluble que dans des solvants peu communs, 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 N-N diméthylacétamide qui contient 5 à 8% du chlorure de lithium (LiCl) **[46]**, le diméthylformamide/chlorure de lithium ou l'acide

trichloroacétique / dichloroéthane [47]. Récemment on a rapporté un nouveau solvant de la chitine qui est le méthanol saturé par le chlorure de calcium dihydraté [46].

De nombreux dérivés de chitine ont été préparés dans le but d'améliorer la solubilité, le plus simple étant le chitosane obtenu par désacétylation.

II.2 Le chitosane

Contrairement à la chitine, le chitosane est peu répandu dans la nature. Il se trouve dans certains champignons, les zygomycètes, et dans la paroi abdominale des reines de termites.

Le chitosane est un polyaminosaccharide naturel, non toxique, biocompatible et biodégradable. Il est non ramifié une fois soluble dans un milieu acide dilué c'est-à-dire qu'il est chargé positivement à des $\text{pH} < 6.4$ et c'est cette charge qui suscite l'intérêt de son application et qui attire les substances chargées négativement [48].

Le chitosane est donc obtenu par N-désacétylation partielle de la molécule de chitine. Sa structure chimique résulte de l'enchaînement d'unités de répétition N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine liées en β (1 \rightarrow 4) (figure 11).

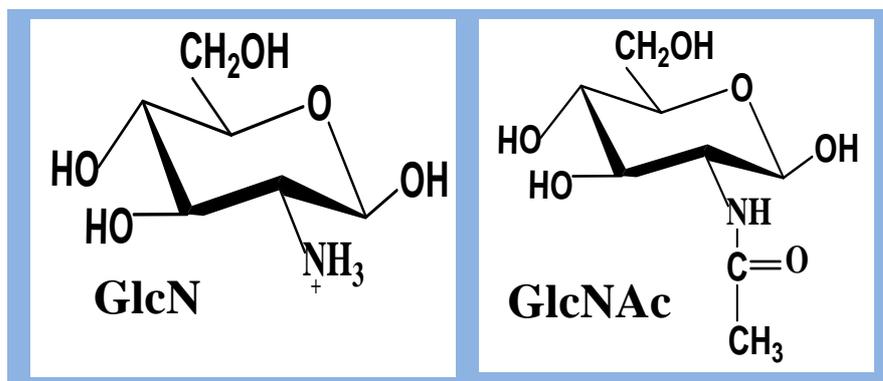


Figure 11: Structure chimique des molécules glucosamine sous sa forme protonée (GlcN) et N-acetylglucosamine (GlcNAc).

La chitine et le chitosane se différencient par la proportion des unités acétylées présentes dans le copolymère, appelée aussi le degré d'acétylation (noté DA). Bien que le terme « chitosane » soit habituellement limité à toute chitine suffisamment N-désacétylée pour être soluble en milieu acide dilué, il n'existe pas de nomenclature officielle proposant la limite précise entre les deux termes. En conséquence, nous appellerons chitosane tout échantillon avec des degrés d'acétylation résiduels $(\text{DA}) \leq 30\%$ [49].

Le chitosane a trois types de groupes fonctionnels réactifs, un groupement amine et deux groupements hydroxyles en positions C2, C3 et C6 respectivement (figure 12). Grâce à ses

groupements amines libres, ce composé possède des propriétés intéressantes très différentes de celles de la chitine. Le chitosane, soluble dans les acides faibles, possède une charge positive alors que la plupart des polysaccharides sont chargés négativement [50].

Le degré de désacétylation (DD) représente la proportion d'unités amine-D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités glycosidiques. Dans le cas du chitosane, le DD est supérieur à 70% pour les produits commerciaux. Cette valeur détermine également la limite de solubilité de ce polymère dans les solutions acides diluées ($2 < \text{pH} < 6,2$). Le DD est un paramètre structural qui influence les propriétés physico-chimiques telles que la solubilité, la charge globale et la réactivité, les propriétés mécaniques comme l'élongation à la rupture, la résistance à la traction. Il influence également les propriétés biologiques [51] comme la biocompatibilité, la biodégradabilité et l'activité biostimulante et anticholestémiant.

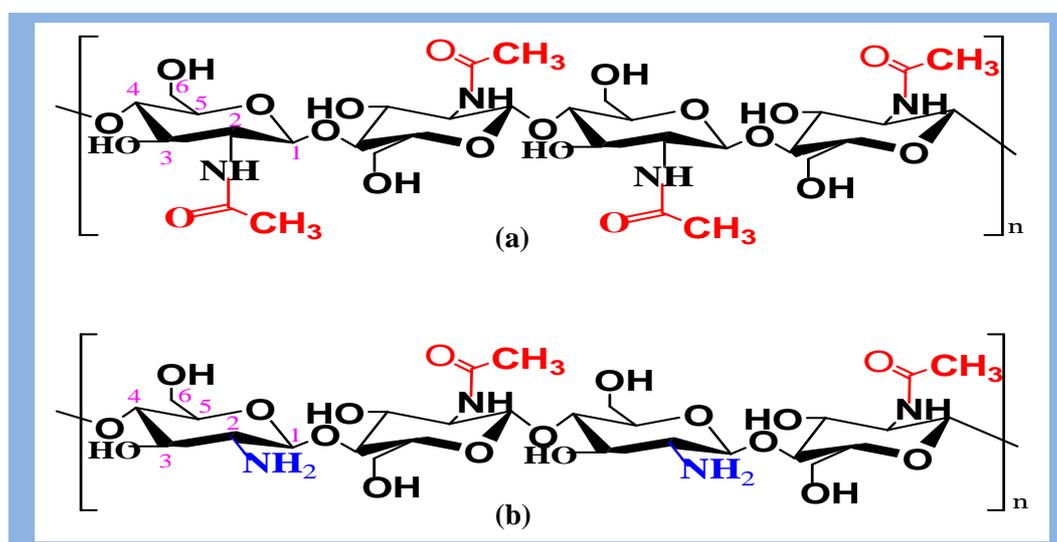


Figure 12: Structures de la chitine (a) et du chitosane (b)

II.2.1 Production de chitosane à partir de la chitine (Processus de désacétylation)

Les techniques actuelles permettent, à partir des déchets, d'aboutir à une déminéralisation et à une déprotéinisation convenables de la carapace et donc à une chitine partiellement purifiée. On peut ensuite, en fonction des exigences, procéder à des purifications supplémentaires afin d'obtenir un produit ultra-pur débarrassé de toute protéine. En partant de la chitine, on peut également moduler à souhait le degré d'acétylation et la masse molaire du polymère, pour obtenir des chitosanes variés grâce à des hydrolyses basiques contrôlées.

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. 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. Un DA inférieur à 10 % est rarement atteint par un procédé simple, la désacétylation totale nécessite plusieurs étapes. L'échantillon étant soit lavé, soit dissous et reprecipité entre deux cycles.

La désacétylation est généralement effectuée par le traitement avec l'hydroxyde de sodium (NaOH) ou potassium (KOH) concentré (40-50 %) à une température ≥ 100 °C, pendant au moins 30 minutes pour enlever certains ou tous les groupements acétyle de la chitine [42]. **Muzzarelli** [52] a rapporté que la désacétylation ne peut pas être réalisée avec un réactif acide. Il y a plusieurs facteurs essentiels qui affectent le rendement de désacétylation comme la température, la durée, la concentration d'alcalin, les traitements préalables pour l'obtention de la chitine telle que les radiations [41], l'atmosphère (air ou azote), la quantité de chitine par rapport à la solution alcaline et la taille des particules. Compte tenu de ces paramètres, l'objectif idéal de désacétylation est de préparer un chitosane qui est non dégradé et parfaitement soluble dans l'acide dilué (acides acétique, lactique, citrique,...) (Figure 13).

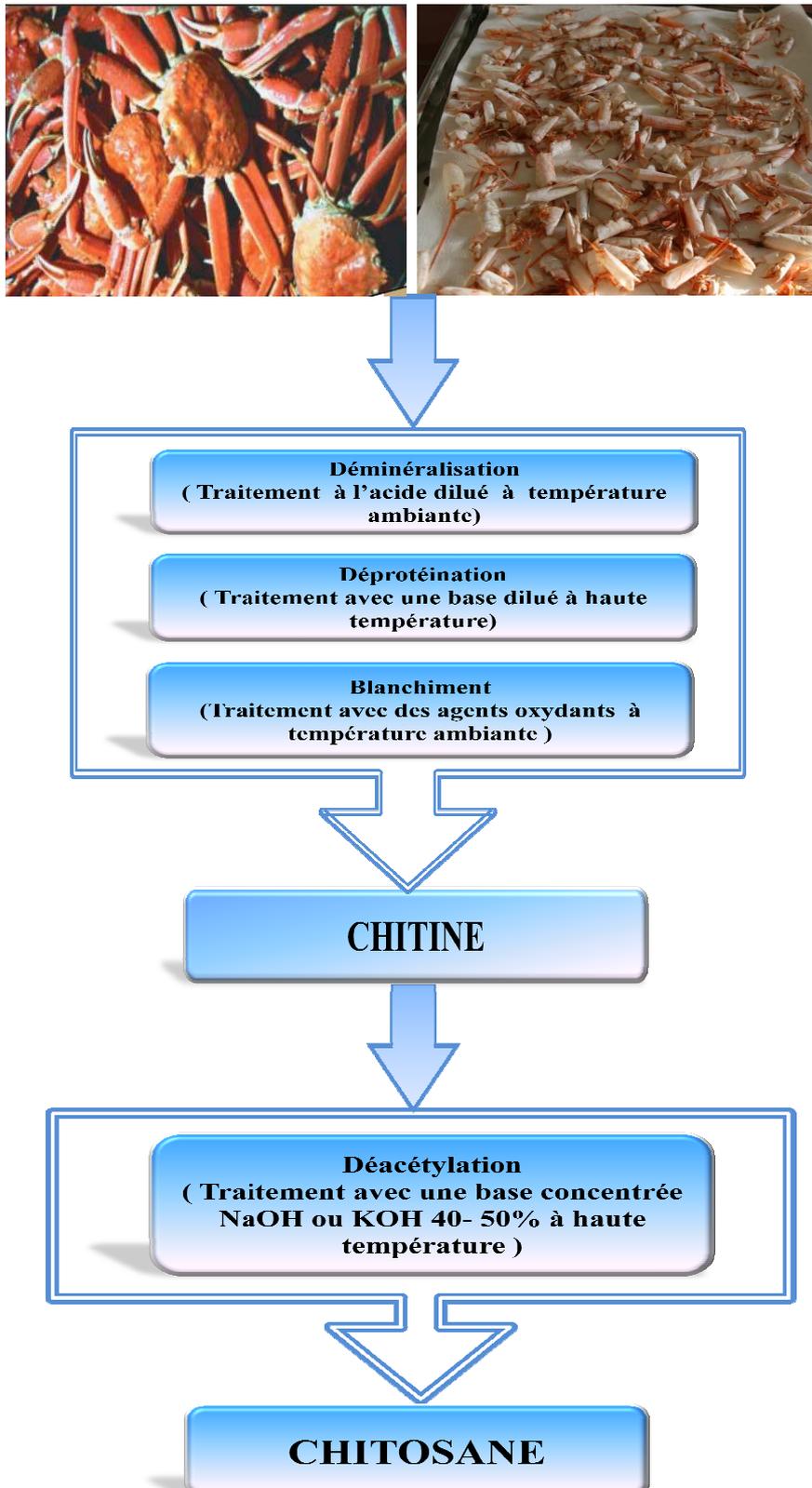


Figure 13: Procédure générale pour l'obtention du chitosane

Compte tenu de sa structure chimique, et en mettant à profit ses diverses propriétés spécifiques, le chitosane trouve des applications importantes dans plusieurs domaines et dans différents pays du monde comme le montre les tableaux 4 et 5 ci-dessous :

Tableau 4 : Estimation de la quantité du chitosane utilisée pendant l'année 2000 (Tonnes) [46]

<i>Domaine d'utilisation</i>	<i>Amérique du nord</i>	<i>Europe</i>	<i>Asie</i>	<i>Autre pays</i>	<i>Total</i>
<i>Traitement des eaux</i>	125	25	200	50	400
<i>Préservation des aliments</i>	0	0	125	25	150
<i>Oligosaccharides</i>	0	0	150	0	150
<i>Agriculture</i>	25	0	75	25	125
<i>Cosmétique</i>	25	25	50	0	100
<i>Textiles (hygiénique)</i>	0	0	50	0	50
<i>Pulpe et papier</i>	25	0	25	0	50
<i>Domaine alimentaire</i>	10	0	25	10	45
<i>Domaine médical</i>	1	1	1	0	3
<i>Total</i>	211	51	701	110	1073

Tableau 5 : Principales applications du chitosane

<i>Domaine d'application</i>	<i>Intérêt</i>
Agriculture	Stimuler le mécanisme de défense des plantes.
	Stimuler la croissance des plantes
Traitement des eaux	Floculant et clarification d'eau
	Précipitation d'ions métalliques
	Réduire les odeurs
	Bactéricides
Alimentaire	Indigestible par l'humain (fibre diététique)
	Réduire le cholestérol par fixation des lipides
	Épaississant et stabilisant
	Protecteur, fongistatique et antibactérien
Cosmétique	Hydratant de la peau
	Traitement de l'acné
	Améliorer la souplesse des cheveux
Biopharmaceutique	Immunologique, anti tumoral
	Hémostatique and anticoagulant
	Bactériostatique
	Libérations contrôlées de principes actifs

II.2.2 Propriétés physico-chimiques

La chitine et le chitosane sont principalement caractérisés par leur degré d'acétylation (DA) et par leur masse molaire, dont la détermination nécessite la mise en solution du polymère. De nombreuses méthodes sont proposées afin de déterminer le DA sur des échantillons solides: la spectroscopie Infra Rouge à Transformée de Fourier **Fernandez C et al [53]**, l'analyse élémentaire qui a été réalisée par **Pelletier et al [54]** et qui montre que le rapport Azote/Carbon (N/C) est considérablement différent dans la chitine et le chitosane, la RMN solide **[35]**, ou sur des

échantillons en solution : dosage par la spectroscopie UV-visible [55], titrage potentiométrique [56], l'HPLC (Haute Performance Liquide Chromatographie) [57] et RMN liquide.

La chitine est soluble dans très peu de solvants. Sa masse molaire initiale est de l'ordre de 800 000 à 10^6 g.mol^{-1} et elle est généralement fortement acétylée. Les chitosanes obtenus industriellement ont une masse molaire de l'ordre de 200 000 g.mol^{-1} et un DA allant de 2 à 25%. Pour le chitosane, la masse molaire et la répartition des motifs N-acétylés le long de la chaîne sont dépendantes de la méthode de désacétylation utilisée. De plus, un enchaînement successif de plusieurs motifs N-acétylés confère au polymère un caractère plus hydrophobe, et donc des propriétés autoassociatives (propriétés épaississantes et gélifiantes) et modifie sa solubilité.

En raison de sa solubilisation en solution acide, le chitosane se comporte comme un polyélectrolyte cationique de forte densité de charge. Ses propriétés dépendent du pH du milieu. Le chitosane est solubilisé et il devient cationique quand le pH est inférieur au pKa intrinsèque de la fonction amine du chitosane soit 6,3 [58]. A un pH supérieur (>6,4), les groupements ne sont plus ionisés et le chitosane se précipite. Autour de pH 6, le nombre de fonctions amine libres devient suffisamment élevé pour induire une association des chaînes et la précipitation du polymère. La viscosité du chitosane en solution est influencée par différents facteurs, comme le DA, la masse molaire, la concentration, la force ionique, le pH et la température.

II.2.3 Hydrogels réticulés du chitosane formés par interactions ioniques

Le chitosane peut former des gels dites gels physiques par interactions ioniques avec des poly-anions de petite ou de grande masse molaire [59, 60].

Les contre-ions, de faible masse molaire les plus employés sont le pyrophosphate, le sodium tripolyphosphate (TPP), le tétrapolyphosphate, l'hexametaphosphate, le sulfate de sodium Na_2SO_4 , $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$. **Bodmeier et ses coll** ont été les premiers à étudier la gélification du chitosane avec le TPP pour l'encapsulation de médicament [61]. Le TPP est le poly-anion le plus couramment utilisé pour la réticulation ionique du chitosane.

D'autres poly-anions de masses molaires élevées sont également utilisés tels que l'acide polyaldéhydocarbonique et le poly(1-hydroxy-1-sulfonate-2-propène) ainsi que des contre-ions hydrophobes tels que le sulfate d'octyle, le sulfate de lauryle et le dioctylsulfosuccinate. Dans ce dernier cas les interactions hydrophobes qui se mettent en place entre les chaînes alkyles des contre-ions contribuent également au mécanisme de gélification.

Quelle que soit la masse molaire des anions, le processus de gélification est dû à la formation de réticulations ioniques inter et intramoléculaires [62]. Un paramètre important à considérer pour la formation de l'hydrogel est le pH pendant la réaction de réticulation. En effet, si le pH est trop élevé, les charges positives du chitosane sont neutralisées et le système précipite. Afin d'éviter la précipitation de chitosane, le pH de la solution ne doit pas être supérieur à 6.

A noter qu'il est possible d'optimiser les propriétés physico-chimiques des gels de chitosane en modifiant la charge du polymère, le taux d'enchevêtrement des chaînes et la nature des contre ions.

II.3 Propriétés biologiques de la chitine et du chitosane

La chitine et le chitosane reçoivent actuellement un grand intérêt pour leurs applications dans le domaine médical et pharmaceutique parce qu'ils présentent des propriétés intéressantes qui permettent de les utiliser dans le domaine biomédical comme la biocompatibilité, la biodégradabilité et la non toxicité. Ils sont connus aussi pour d'autres propriétés telles que: analgésiques, mucoadhésivité, antitumorale, hémostatique, hypocholestérolémique, antimicrobienne et antioxydant. Dans ce manuscrit on va développer quelques unes que nous avons exploité dans notre travail.

II.3.1 La biodégradabilité

La chitine et le chitosane peuvent être dégradé par plusieurs protéases : lysozymes, papaïnes, pepsines...et leur dégradation libère des oligosaccharides non toxiques. La vitesse de dégradation est inversement proportionnelle au degré de cristallinité qui lui-même dépend du degré de désacétylation (DD). Donc la distribution des groupements acétyles affectent la biodégradabilité et la désacétylation réduit la vitesse enzymatique de dégradation, c'est-à-dire plus le chitosane est désacétylé plus la vitesse de dégradation est moins importante. Plusieurs auteurs rapportent que cette variation de la vitesse de dégradation provient de la variation dans la distribution des groupements acétamides qui influence la viscosité du polymère en solution à cause des liaisons inter et intra moléculaires qui diffèrent de type α - au type β - de la chitine qui à servi pour la synthèse du chitosane.

Plusieurs études ont rapporté que la masse moléculaire (M_w) du polymère influence la biodégradabilité [63].

II.3.2 La biocompatibilité

La chitine et le chitosane possèdent une bonne biocompatibilité vis-à-vis des cellules hôtes, mais cette propriété dépend des caractéristiques du polymère à savoir la source d'extraction, la méthode de préparation, Mw et le DD.

Le chitosane présente une grande cytocompatibilité *in vitro* que la chitine et cela a été démontré *in vitro* sur des cellules myocardique, endothélial, épithélial et sur des fibroblastes, hépatocytes, condriocytes et kératinocytes. La biocompatibilité est reliée uniquement au DD, quand la charge positive du polymère augmente les interactions entre le chitosane et les cellules augmentent à cause de la présence du groupement amine libre. L'adhésion cellules-polymère dépend à la fois du DD et de la nature des cellules, elle est plus importante avec des cellules fibroblastes qui présentent des charges négatives à leur surfaces que les kératinocytes et leur prolifération diminue avec l'augmentation du DD [63].

II.3.3 La mucoadhésivité

La mucoadhésivité dépend de plusieurs facteurs tels que les variables physiologiques et les propriétés physicochimiques du chitosane.

Les muqueuses sont composées d'une glycoprotéine appelée la mucine, riche en résidus d'acide siliques, qui lui confère la charge négative. L'ampleur de cette union dépend de la quantité de cet acide et la masse moléculaire et le DD. D'une part quand le Mw du chitosane augmente, la pénétration dans la couche de la mucine augmente, en conséquence la mucoadhésivité devient plus importante. D'autre part le DD joue un rôle principal dans l'amplification de la densité de charge de la molécule [63].

Huang et al [64] ont étudiés l'effet de la Mw et le DD sur la mucoadhésivité *in vitro* des nanoparticules du chitosane et ils ont démontrés que l'affinité des liaisons est proportionnelle au Mw et au DD.

II.3.4 Activité antibactérienne du chitosane

Deux mécanismes ont été suggérés pour expliquer l'action antimicrobienne du chitosane.

Le premier mécanisme serait dû essentiellement à la charge positive du chitosane qui interagit avec les phospholipides membranaires chargés négativement. L'interaction crée une perturbation au niveau de la membrane avec une diminution des échanges de nutriments entre la bactérie et le milieu

extérieur qui entraîne la mort cellulaire. Par ailleurs, **Helander et al [65]** ont prouvé que la clé de l'activité antimicrobienne du chitosane provient de la charge positive des groupements amine. Le même résultat a été montré par **Tsai et Su [66]** pour lesquels le mécanisme d'action antimicrobienne de chitosane est dû aux interactions entre les cations du chitosane et les anions à la surface des bactéries qui modifient la perméabilité de la membrane cellulaire.

Le second mécanisme implique la perturbation du chitosane de la synthèse des ARN messagers en interaction avec l'ADN.

II.4 Applications générales de la chitine et du chitosane

Les propriétés particulières du chitosane sont liées essentiellement à la présence de la fonction amine portée par le carbone 2. Elles sont de deux types:

➤ A pH acide, où il est soluble, le chitosane porte de nombreuses charges positives. Il est donc un bon agent de floculation et un bon agent de coagulation. Il peut interagir avec des molécules chargées négativement (par exemple acides gras, protéines ...) [67] et former ainsi des complexes polyanion-polycation. Cette propriété lui ouvre de multiples applications notamment en dermo-cosmétologie : elle permet d'interagir de façon très intime avec les kératines de la peau et ainsi former un film à la surface de celle-ci.

➤ A pH plus élevé (> 6.4), le chitosane perd ses charges positives, le doublet électronique de l'azote est libre. Ces doublets libres et la présence de nombreux atomes d'oxygène dans le chitosane lui permettent de se comporter comme un excellent complexant, en particulier des métaux lourds. Il est donc utilisé pour la purification des eaux, par exemple pour la récupération de métaux dans les effluents industriels.

Le chitosane est devenu un polymère très important et de plus en plus il est beaucoup utilisé dans le domaine médical vu ses propriétés de non toxicité et de mucoadhésivité, dans le tableau qui suit nous regroupons les principales propriétés relatives à son application dans ce domaine.

Tableau 6: Principales propriétés du chitosane en relation avec ses applications biomédicales

<i>Application biomédicale</i>	<i>Principales caractéristiques</i>
Sutures chirurgicales	Biocompatible
Implant dentaire	Biodégradable
Lentilles de contact cornéennes	Agent d'hydratation
Systèmes de libération de principes actifs pour les humains et les animaux	Non toxique, tolérance biologique
Encapsulation des agents antibiotiques	Hydrolyse par des lysozymes, Propriétés curatives Propriétés antibactériennes.

II.5 Applications biomédicales de la chitine et du chitosane

Grâce à sa grande biocompatibilité, le chitosane est employé dans les formes des systèmes à libération de principes actifs, les implants, les formes injectables et des prothèses orthopédiques.

Dans notre étude on s'intéressera à l'application du chitosane dans le domaine biomédicale pour la formulation d'un système de libération de principes actifs.

○ Systèmes de libération de principes actifs

Parmi les applications industrielles importantes du chitosane dans les systèmes à libération de principes actifs les nanoparticules, microsphères, films, hydrogels et comprimés.

Vu le caractère cationique du chitosane celui là est capable de réagir avec les polyanions pour former des complexes polyélectrolytes, pour cela trois caractéristiques de ce polymère doivent être considérées : le Mw, DD et la pureté. La sélection d'un type de chitosane avec certaines caractéristiques est très recommandé afin d'assurer un temps d'activité biologique prolongé, améliorer l'effet thérapeutique et réduire les effets secondaires.

Toutes les études montrent que le DD et Mw du chitosane jouent un rôle important dans la libération du principe actif à travers la matrice polymérique.

Gupta et Jabrail [68] ont étudié l'effet du DD et le degré de réticulation sur les caractéristiques physiques, le gonflement et la libération du principe actif des microsphères du chitosane. Le DD

contrôle le degré de cristallinité et l'hydrophobicité du chitosane dû à la variation des interactions hydrophobes lesquelles contrôlent la charge et les caractéristiques de libération de la matrice du polymère. Le DD contrôle les liaisons formées par le chitosane et d'autres polyanions. Un DD important se traduit par un nombre important de groupes amino libres, par conséquent le nombre de liaisons formées sera important. Quand ces auteurs ont étudié l'influence de ces liaisons et le DD sur la taille et la rugosité de la surface des nanoparticules formées, ils ont trouvé que la taille et la rugosité de la surface diminuent avec l'augmentation de l'importance des liaisons établies et le DD.

Zhang et ses coéquipiers [69] ont rapporté que le DD et le poids moléculaire moyen du polymère sont indispensables pour contrôler la distribution de la taille des nanoparticules. Un grand DD et un grand degré de réticulation augmentent l'hydrophobicité et les nanoparticules deviennent plus compactes, cela induit un contrôle du taux de gonflement et la quantité du principe actif diffusée de la matrice du polymère vers le milieu physiologique. Un DD entre 48-62% augmente le taux d'encapsulation d'une manière très considérable et le nombre de pores qui résultent.

Et quand le DD est faible on a remarqué une libération brusque du principe actif.

Desai et Park [70] ont étudié l'influence du Mw sur la formation des microsphères formées par le tripolyphosphate de sodium, ils ont observé que lorsque Mw augmente ils forment des sphères plus régulières et l'augmentation de la Mw augmente la taille des microsphères. Ils ont aussi observé que les microsphères préparées avec un poids moléculaire important du chitosane présentent un faible taux de gonflement et un grand degré de réticulation contrairement aux microsphères préparées par un chitosane avec un poids moléculaire moyen qui présentent moins d'interactions intermoléculaires ce qui favorise la libération du principe actif. Ces auteurs ont observé que la vitesse de libération de la vitamine C est d'autant moins importante que le Mw du chitosane est grande. Un faible Mw est à l'origine de la mauvaise rétention du principe actif à l'intérieur des microsphères à cause de l'importance du taux de gonflement.

CHAPITRE III: LES COLLYRES ET LES AMINOSIDES

Les préparations ophtalmiques sont des préparations liquides, semi solides ou solide stériles destinées à être appliquées sur le globe oculaire et/ ou les conjonctives, ou à être introduites dans le sac conjonctival.

La principale forme destinée à la voie ophtalmique ou oculaire est la forme *collyre*.

III.1 Définition des collyres

Les collyres sont des solutions ou des suspensions stériles, aqueuses ou huileuses contenant un ou plusieurs principes actifs et destinées à l'instillation oculaire. Lorsque la stabilité l'exige, les substances médicamenteuses peuvent être présentées sous forme sèche et stérile à dissoudre ou à mettre en suspension dans un liquide stérile approprié immédiatement avant l'emploi.

A l'origine les collyres étaient de petits bâtonnets en forme d'une petite queue à base de principe actif et de matière plastique ou colle (du Grec Kollurion : colla= colle et oura=queue). Ces bâtonnets étaient délayés dans un liquide, de l'eau en général au moment de l'emploi.

A la pharmacopée figurent, en plus des collyres, les solutions pour lavages ophtalmiques, les poudres pour collyres ou pour solutions pour lavages ophtalmiques, les préparations ophtalmiques semi solides et les inserts ophtalmiques.

III.2 Rappels sur l'anatomie et la physiologie de l'œil

La figure 14 représente de façon schématique les différentes parties de l'œil. Deux d'entre elles qui nous intéressent particulièrement, celles qui sont en contact avec les collyres : la cornée et la conjonctive.

a) **La cornée** : elle est transparente et elle n'est pas vascularisée mais est richement innervée par les terminaisons des nerfs ciliaires, voie sensitive du reflexe cornéen. Les

affections de la cornée sont désignées sous le nom de Kératites. La cornée est elle-même formée de trois couches : l'Épithélium, le Stroma et l'endothélium.

- **L'épithélium** est le tissu le plus extérieur, il est de nature lipophile. Les autres couches sont de nature hydrophile. Pour conserver la cornée, la substance doit être à la fois lipophile et hydrophile.

b) La conjonctive : est une muqueuse qui forme la jonction entre les paupières et la cornée. Elle comporte deux feuillets : l'un tapisse la face interne des paupières et l'autre correspond à la surface du blanc de l'œil, la zone de jonction des deux feuillets constitue les culs-de-sac conjonctivaux. La conjonctive est très richement vascularisée et devient rouge en cas d'irritation.

On retrouve aussi la glande lacrymale qui n'est pas représentée sur le schéma. Elle se trouve dans l'angle externe supérieur de l'œil. Elle sécrète les larmes qui humidifient continuellement la surface de la cornée avant de s'écouler par le canal lacrymal.

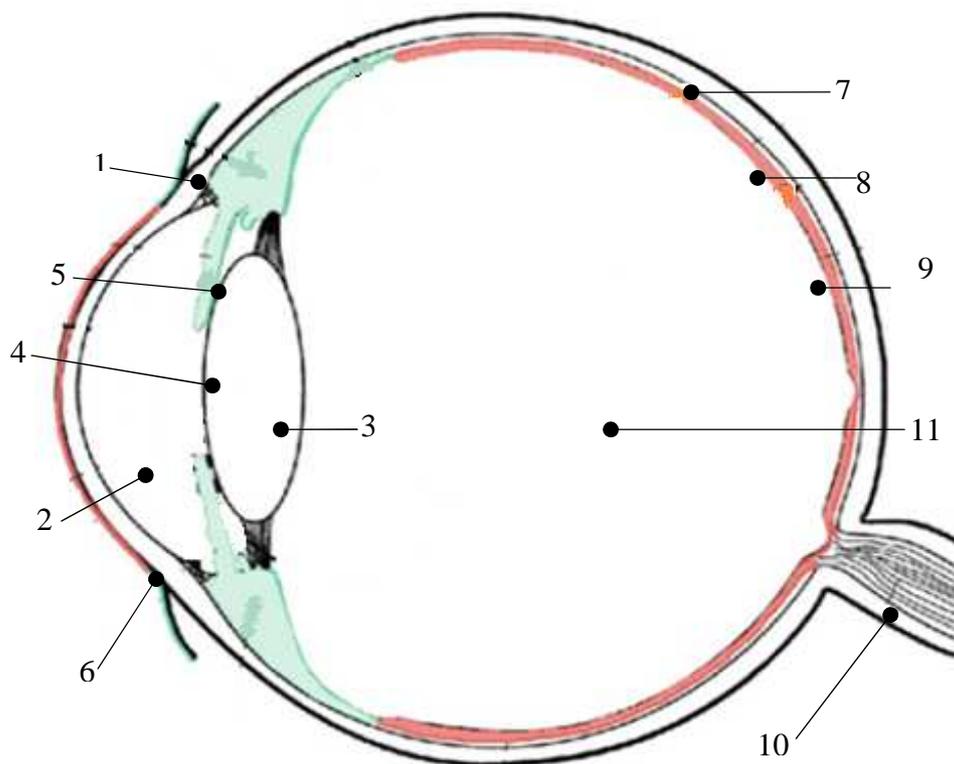


Figure 14: Globe oculaire

- | | | |
|-------------------|----------------|------------------|
| 1. Conjonctive | 5. Iris | 9. Rétine |
| 2. Humeur aqueuse | 6. Cornée | 10. Nerf optique |
| 3. Cristallin | 7. Sclérotique | 11. Humeur |
| 4. Pupille | 8. Choroïde | |

L'œil est en fait recouvert en permanence d'un film lacrymal de 8 μm d'épaisseur environ. Ce film est structuré et comporte une couche extérieure lipidique. Il joue plusieurs rôles :

- Maintien de l'humidification,
- Protection contre les agents extérieurs,
- Rôle nettoyant
- Rôle métabolique : il emporte à la cornée la plupart des substances nécessaires à son métabolisme.

Un collyre se comporte toujours pour l'œil comme un corps étranger c'est-à-dire que son instillation risque de provoquer avec plus ou moins d'intensité selon les cas :

- Fermeture des paupières,
- Larmolement,
- Une réaction douloureuse,
- Une rougeur de la conjonctive.

La formulation des collyres doit donc être telle que ces réactions soient minimales. Ils ne doivent pas, en particulier, déclencher un larmolement qui entraîne instantanément le principe actif.

De toute façon puisque le flux est continu, même à l'état normal, une grande partie du collyre est dirigée vers les fosses nasales par le canal lacrymal. Le temps de persistance sur la cornée et la conjonctive est donc toujours réduit à quelques minutes seulement. Les dernières traces ne demeurent pas sur l'œil au-delà de 15 à 25 minutes. De là, la nécessité, dans certaines affections, d'instillations souvent répétées ou remplacement du collyre liquide par une pommade ophtalmique, ce qui rend son application onéreuse.

On administre par cette voie des anti-inflammatoires, des anesthésiques locaux, des vitamines, des enzymes, etc.

III.3 Pénétration des principes actifs

La plupart des médicaments destinés à pénétrer dans l'œil passent par la voie transcornéenne. Une grande partie de ceux qui pénètrent dans la conjonctive est entraînée dans la circulation sanguine générale et peuvent causer des réactions systémiques.

D'après ce qui vient d'être dit, du principe actif administré sous forme d'une goutte de collyre, une grande partie est entraînée par le liquide lacrymal et il n'y a qu'une petite fraction qui pénètre dans l'œil. Cependant deux faits sont constatés :

- La pénétration bien que très faible peut être suffisante pour avoir une action thérapeutique.
- De nombreux principes administrés en collyres n'ont pas à être absorbés. Il ne leur est demandé qu'une action de surface (exemple : antiseptique).

Tout ceci montre que la mise au point d'un collyre est toujours une affaire délicate.

III.4 Propriétés des collyres

Les qualités que doivent avoir les collyres sont assez voisines de celles qui sont demandées pour les solutions injectables. Ils doivent être limpides, inodores, neutre, de même pression osmotique que les larmes et surtout stériles. Seules les trois dernières présentent certains aspects particuliers par rapport aux préparations injectables. Pour les suspensions, la pharmacopée ajoute un contrôle de taille des particules.

III.4.1 Neutralité, ajustement du pH

Le pH du liquide lacrymal est approximativement compris entre 7,4 et 7, en principe on devrait préparer des collyres de pH compris dans cette gamme mais, en fait, on a constaté que l'œil pouvait supporter sans réagir de plus grands écarts. On peut donc sortir de ces limites si le médicament n'est pas stable dans cette zone de pH, ceci du fait que les larmes possèdent un certain pouvoir tampon.

L'ajustement à la neutralité n'est pas toujours possible (instabilité, précipitation à la neutralité ou variation de l'activité en fonction du pH). Souvent il est nécessaire d'adopter un compromis en choisissant un pH situé entre les limites de stabilité du principe actif d'une part et la tolérance de l'œil d'autre part.

III.4.2 Pression osmotique

Il a été démontré que les larmes avaient la même pression osmotique qu'une solution à 9‰ de chlorure de sodium c'est-à-dire la même que le sang. Dans la pratique, il a été démontré, que l'œil pouvait supporter des concentrations différentes de la valeur théorique. On peut atteindre des concentrations différentes de la valeur théorique. On peut atteindre des concentrations de 7 à 14‰ de chlorure de sodium sans sensation de douleur et sans larmoiement important dans le cas d'un œil sain.

III.4.3 Stérilité

Un problème particulier est posé par la conservation de la stérilité des collyres multidoses au cours de l'utilisation.

Un collyre est administré goutte par goutte et, au cours de chaque prélèvement, il peut y avoir contamination de la préparation, avec comme conséquences possibles : culture bactérienne, modification de pH, altération des principes actifs et infection ultérieure de l'œil. La seule possibilité pour éviter que les microorganismes introduits accidentellement au cours du prélèvement, se multiplient dans le collyre est d'ajouter dans celui-ci des conservateurs antimicrobiens. Ceux-ci doivent être inoffensifs pour la cornée et la conjonctive, compatibles avec les principes actifs et efficaces à faibles doses.

De toute façon, il ne faut pas utiliser un collyre longtemps après la première ouverture du récipient, au maximum 4 semaines.

Pour l'essai de stérilité, la pharmacopée précise les conditions de prélèvement et d'ensemencement dans le cas des préparations ophtalmiques.

III.4.4 Limites de taille des particules

Cet essai est exigé pour les collyres présentés sous forme de suspension. Examinés au microscope dans une chambre appelée 'chambre d'hymocétomètre', une prise d'essai de 10µg de la phase solide ne doit pas contenir plus de 20 particules de plus de 25µm, plus de 2 particules de plus de 50µm et aucune particule de plus de 90µm [71].

III.5 Les aminosides

III.5.1 Structure chimique et classification

La structure chimique des antibiotiques du groupe des aminoglycosides ou aminosides comporte un ou plusieurs fragments de dérivés aminés des sucres (exemple : glucosamine, déoxystreptamine, néosamine, etc.). A cette particularité, ils doivent leur dénomination d'aminosides mais aussi leurs caractères de polycation (basique) expliquant leurs possibilités très restreintes de diffusion à travers les membranes biologiques, (pas de résorption per os [72]). Ils sont divisés en 3 classes :

Tableau 7 : Classes des aminosides [73]

a. Les déoxystreptamines bisubstituées 4-5 qui comprennent	b. Les déoxystreptamines bisubstituées 4-6 qui comprennent	c. Les autres
<ul style="list-style-type: none"> • Néomycine B ou C • Paromomycine • Lividomycine A ou B • Ribostamycine • Framycétine 	<ul style="list-style-type: none"> • Kanamycines A, B, C et dérivés • Amikacine • <u>Tobramycine</u> • Dibékacine • Gentamicines C1-C1a-C2a • Sisomycine • Nétilmicine 	<ul style="list-style-type: none"> • Streptomycine • Streptidine • Spectinomycine

III.5.2 Mode d'action

La cible principale des aminosides est le ribosome dont ils perturbent le fonctionnement. Les aminosides pénètrent à l'intérieur de la bactérie selon un processus en trois étapes :

- La première correspond à une pénétration passive et rapide au travers de la paroi bactérienne. Dans le cas des bactéries Gram positif, le peptidoglycane est franchi. Dans le cas des bactéries Gram négatif, l'antibiotique doit tout d'abord franchir une première membrane externe lipophile puis le peptidoglycane pour arriver à la membrane cytoplasmique.
- Les deuxième et troisième étapes correspondent au transport actif de l'aminoside au travers de la membrane. Dans la cellule, ils se lient aux ribosomes et induisent une erreur ou

une inhibition de la traduction des protéines de la cellule. La formation de ces protéines anormales augmente la perméabilité bactérienne, altère la respiration cellulaire et conduit à la mort bactérienne.

L'activité bactéricide de ces antibiotiques résulterait de ces effets pléiotropes. Il y a également un effet post antibiotique. Après que l'effet bactéricide initial des aminosides s'est exercé et les concentrations de l'antibiotique au site sont devenues inférieures à la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice), on pourrait s'attendre à la reprise de la croissance bactérienne. La période pendant laquelle la population bactérienne exposée à l'aminoside reste en phase de latence avant de reprendre sa croissance définit l'effet post antibiotique. L'effet post antibiotique peut s'expliquer par les actions précédentes, mais aussi par une fixation irréversible de l'antibiotique sur des sites cellulaires à découvrir.

III.5.3 Propriétés pharmacocinétiques

Le caractère hydrophile des aminosides conditionne étroitement les paramètres pharmacocinétique.

III.5.3.1 Absorption

Les aminosides ne sont pas (ou très peu) absorbés par voie digestive, mais ils conservent leur activité locale. Ce sont des antibiotiques administrés par voie parentérale (intramusculaire généralement et intraveineuse) et par voie ophtalmique.

III.5.3.2 Distribution

L'hydrophilie explique une faible fixation aux protéines plasmatiques (< 10%). Les aminosides se concentrent dans les liquides extracellulaires et pénètrent mal dans le tissu adipeux, le cerveau et le liquide céphalorachidien. Des temps de demi-vie plasmatique voisins de 2h, des volumes de distribution faibles et une faible diffusion méningée sont les caractéristiques pharmacocinétiques essentielles de ces antibiotiques. Les aminosides, présents au niveau du rein sous forme cationique, se fixent aux phospho-inositols anioniques. Il s'ensuit une accumulation dans le cortex rénal à des concentrations 12 à 20 fois supérieures à celle du plasma, expliquant la toxicité rénale importante de ces molécules, dont il faut absolument tenir compte chez l'insuffisant rénal. Les aminoglycosides se distinguent aussi par

leur affinité importante vis-à-vis des cellules cochléaire, après passage dans les différents espaces lymphatiques du conduit cochléaire de l'oreille interne. Cette affinité est responsable des effets ototoxiques (*vide infra*), d'autant plus que la persistance de l'antibiotique serait favorisée par une fixation à des protéines particulières présentes au niveau de l'oreille interne.

III.5.3.3 Métabolisme

La biotransformation des aminoglycosides est pratiquement inexistante.

III.5.3.4 Elimination

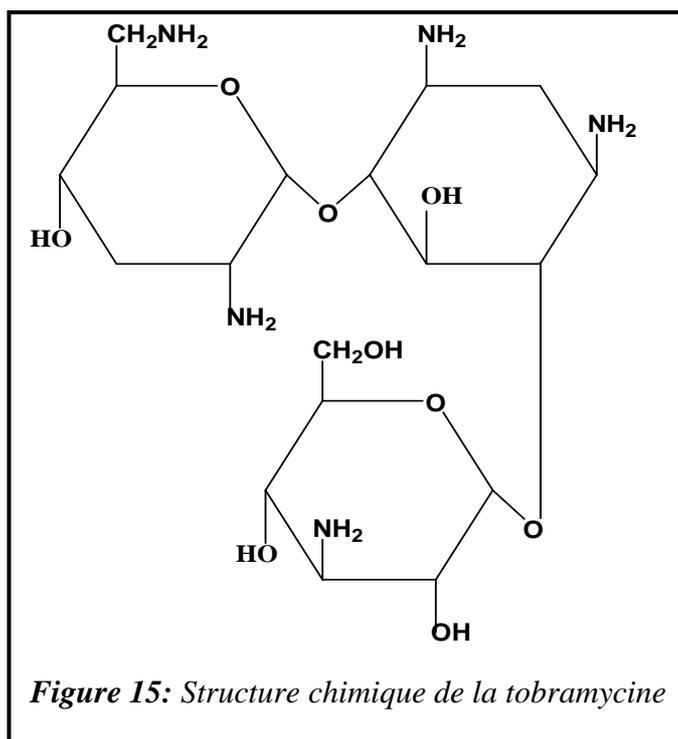
Les aminoglycosides sont éliminés inchangés par voie urinaire. L'insuffisance rénale rend absolument nécessaire les adaptations posologiques [72].

III.6 La tobramycine

La tobramycine est un antibiotique de la famille des aminosides comme est indiqué au dessus il est utilisé dans le traitement des infections dues à *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus species*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter* et à d'autres micro-organismes. La tobramycine agit comme tous les aminosides en interférant sur la synthèse protéique ribosomale. La tobramycine n'étant pas ou très peu métabolisée, c'est la molécule mère qui est éliminée par filtration glomérulaire. La demi-vie de la tobramycine dans le sérum ou le plasma est étroitement liée à la fonction rénale et est donc variable selon les individus ainsi que dans le temps pour le même individu. La concentration sérique ou plasmatique de la tobramycine dépend également de la voie d'administration, du volume du liquide extracellulaire, de la durée du traitement et des modifications physiologiques survenant au cours de l'affection et du traitement. L'intervalle thérapeutique de la tobramycine doit être mesuré aux concentrations au pic et à la vallée. Une insuffisance rénale préexistante, un traitement à la tobramycine prolongé, de même que les doses supérieures aux concentrations thérapeutiques peuvent conduire à une toxicité auditive et/ou une néphrotoxicité. La surveillance des concentrations de tobramycine au pic et à la vallée dans le sérum ou le plasma est donc essentielle pour la prévention de ces graves complications inhérentes à l'ajustement de la dose administrée [74].

La tobramycine peut être administrée par voie intramusculaire ou intraveineuse [75], solution pour inhalation par nébuliseur (TOBI à 300 mg/5 ml) ou en solution ophtalmique (TOBREX à 0.3%).

La tobramycine ainsi représentée sur la figure 15 est le [O-3-amino-3-déoxy- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O-[2,6-diamino-2,3,6-tridéoxy- α -D-ribo-hexopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-2-déoxystreptamine] de structure moléculaire $C_{18}H_{37}N_5O_9$ et une masse moléculaire de 467,54g/mol, elle est une poudre hygroscopique de couleur blanche à blanc cassé. Il s'agit d'un aminoside aisément soluble dans l'eau.



**DEUXIEME PARTIE: MISE EN
ŒUVRE EXPERIMENTALE ET
TECHNIQUES D'ANALYSES**

I. Introduction

Dans cette partie nous aborderons les points suivants :

- Extraction et transformation chimique de la chitine en chitosane, et la caractérisation physico-chimique de ce dernier et du chitosane commercial, telles que la détermination de son poids moléculaire par viscosimétrie, son degré de désacétylation et sa solubilité.
- Techniques de caractérisation par la technique de diffraction des rayons X (DRX), la spectroscopie infrarouge IRTF, l'analyse thermogravimétrique ATG-ATD et l'analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) de la chitine, chitosane synthétisé et chitosane commercial ainsi que la tobramycine.

Cette partie comprend également :

- Etude de l'effet antibactérien du chitosane synthétisé et du chitosane commercial puis le procédé d'encapsulation de la tobramycine par les deux polymères cités précédemment, à différents pourcentages et pH ainsi que les cinétiques de libération du principe actif dans un milieu salin de larmes artificielles (*in-vitro*).

I.1 Procédé d'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevettes

Les carapaces sont prélevées des crevettes, principale source naturelle originaire de la région côtière de Bejaia, en date du mois de Décembre 2008, qu'on a employée pour l'extraction de la chitine.

Une masse de 1 Kg des crevettes rouges ont été soigneusement décortiquées, puis lavées plusieurs fois avec l'eau de robinet, ensuite à l'eau distillée et pour activer le processus de séchage, les carapaces ont été aspergées avec de l'acétone et étuvées pendant 24h à 55°C.

Afin d'extraire la chitine, une masse d'exosquelettes des crevettes d'environ $P_0 = 40g$, séchés puis broyés à l'aide d'un mortier de laboratoire, sera soumise à un traitement qui repose sur trois étapes essentielles: à savoir l'étape de déminéralisation, puis une étape de déprotéinisation et en dernier une étape de blanchiment. Le procédé d'extraction de la chitine et de désacétylation choisit est celui proposé par **Michael Oduor-Odote P et ses collaborateurs [76]**

Les conditions et les produits de synthèse utilisés sont regroupés dans le tableau 8 ci-dessous :

Tableau 8: Produits chimiques utilisés dans l'extraction de la chitine

<i>Produit chimique</i>	<i>Acide chlorhydrique</i>	<i>Hydroxyde de sodium</i>	<i>Peroxyde d'hydrogène</i>
<i>Formule chimique</i>	HCl	NaOH	H ₂ O ₂
<i>Masse moléculaire (g/mol)</i>	36.5	40	34.01
<i>Densité</i>	1.18	-	1.11
<i>Pureté %</i>	35-37	98	30

I.1.1 Déminéralisation

Dans un erlen de 2 litres, on verse la masse d'exosquelette finement broyée et on ajoute une solution d'acide chlorhydrique à une concentration de 1M, avec un rapport de masse du solide/volume du liquide 1 :15 (w/v). Un volume de 600ml de la solution d'acide chlorhydrique (HCl) est introduit dans l'erlen, puis placé sous agitation magnétique pendant une nuit à la température ambiante, afin de solubiliser le carbonate de calcium et le chlorure de calcium suivant la réaction ci-dessous :



Après réaction on procède à la filtration en transvasant le contenu de l'erlen au dessus d'un büchner munit d'un papier filtre et disposé sur une fiole à vide qui est raccordée à une pompe à vide. On poursuit par un lavage jusqu'à la neutralité, afin d'éliminer l'excès de réactif. On sèche la poudre obtenue dans l'étuve à 50°C pendant une nuit.

I.1.2 Déprotéinisation

La poudre séchée est introduite dans un ballon muni d'un réfrigérant contenant une solution d'hydroxyde de sodium NaOH à 10% avec les proportions solide /liquide 1 :20 (w/v). Le mélange de 300 ml est porté à une température de 100°C dans un chauffe-ballon pendant 6h.

Une filtration sous vide suivie d'un lavage à l'eau distillée puis à l'acétone sont nécessaires jusqu'à neutralité, afin d'éliminer toutes les protéines qui ont été séparées de la chitine. La matière récupérée sera étuvée à 50°C pendant une nuit.

I.1.3 Blanchiment

Cette étape consiste à éliminer les pigments dans les carapaces de crustacées qui forment des complexes avec la chitine, telle que les dérivés de β -carotène.

Afin d'obtenir une chitine quasiment blanche, une extraction préalable par un mélange acétone/éthanol est faite avec les proportions liquide : liquide 1 :1 (v/v), auquel on additionne la matière sèche obtenue lors de la précédente étape, avec un rapport du solide au solvant 1 : 10 (w/v). On laisse sous agitation magnétique durant une nuit. On poursuit avec une filtration, suivie d'un lavage à l'eau distillée, puis avec de l'éthanol et un étuvage pendant une nuit à 50°C.

La matière sèche sera de nouveau traitée avec un agent oxydant qui est le peroxyde d'hydrogène, à une concentration de 0.315% avec un rapport du solide au solvant 1 :10 (w/v), sous agitation magnétique maintenue durant 30mn. On filtre et on lave avec de l'eau distillée et on sèche à l'étuve à une température modérée de 50°C pendant une nuit.

I.2 Procédé de synthèse du chitosane par désacétylation de la chitine

C'est l'étape la plus délicate qui met en œuvre la substitution d'un nombre maximal et suffisant de groupements acétyles, pour aboutir au chitosane. La désacétylation est généralement effectuée par le traitement avec l'hydroxyde de sodium (NaOH) ou potassium (KOH) concentré (40-50 %) à une température ≥ 100 °C. Dans notre cas, on a choisit de travailler avec le NaOH concentré à 50% qui est introduit dans un ballon avec un rapport solide au solvant 1 :20 (w/v), dans lequel le mélange est chauffé à reflux à 120°C pendant 3h. On filtre puis on lave avec de l'eau distillée jusqu'à neutralité. Pour accélérer le processus de déshydratation, on rince avec de l'éthanol et on passe à l'étuve pendant une nuit à 50°C.

- Après chaque étuvage, la matière sèche est pesée pour déterminer le rendement de chaque réaction.

I.3 Détermination de la masse du chitosane par la méthode viscosimétrique

La première caractérisation du chitosane (synthétisé et commercial) est la détermination de son poids moléculaire par mesure de sa masse viscosimétrique. En effet, on a déterminé la viscosité intrinsèque du polymère après plusieurs mesures de la viscosité spécifique. Sachant que la viscosité d'un polymère en solution varie en fonction de sa concentration, et elle peut être déterminée, par la mesure du temps d'écoulement de la solution de polymère de concentration C dans un tube capillaire

de type Ubbelohde. D'après la loi de poiseuille, le temps d'écoulement t d'une solution dans un tube capillaire est directement proportionnel à sa viscosité η selon l'équation suivante :

$$t = \frac{8 * l * v * \eta}{\pi * \Delta p * R^4} \dots\dots\dots [12]$$

Avec :

l : longueur du capillaire Ubbelohde (mm ou cm)

R : rayon du capillaire Ubbelohde (mm)

v : volume de la solution (ml)

Δp : différence de pression hydrostatique entre les extrémités du capillaire

η : viscosité intrinsèque

On définit par t_0 et η_0 respectivement le temps d'écoulement et la viscosité absolue du solvant.

On définit la viscosité relative (η_r) comme le rapport entre la viscosité de la solution du polymère et celle du solvant.

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \dots\dots\dots [13]$$

La viscosité spécifique (η_{sp}) est reliée à la viscosité relative par l'équation ci-dessous:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1 \dots\dots\dots [14]$$

Le rapport viscosité spécifique/concentration d'une solution polymérique définit la viscosité réduite :

$$\eta_{red} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 * C} \dots\dots\dots [15]$$

Dans la limite des dilutions infinies (concentration tend vers zéro), on qualifie la viscosité réduite par l'indice limite de viscosité ou bien viscosité intrinsèque, notée $[\eta]$.

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{red} \quad \text{quand } C \longrightarrow 0 \dots\dots\dots [16]$$

La concentration étant exprimée en g/dl, la viscosité intrinsèque $[\eta]$ est exprimée en dl/g. Le tracé des valeurs η_{sp}/C en fonction de C permet de déterminer la viscosité intrinsèque $[\eta]$, qui coïncide avec l'ordonnée à l'origine.

Staudinger est le premier à avoir postulé, que la viscosité intrinsèque devrait être proportionnelle à la masse molaire. L'expérience a établi que la viscosité $[\eta]$ dépend étroitement de la masse moléculaire du polymère. La relation proposée par Mark et confirmée expérimentalement par Houwink est :

$$[\eta] = KM^a \dots\dots\dots [17]$$

Où :

K : est la constante caractéristique d'un couple polymère-solvant à une température donnée.

a : est une constante caractéristique de la taille et de la forme de la macromolécule ($0.5 < a < 2$). Les valeurs de la constante (a) donne des informations sur la conformation d'un polymère dans un solvant donné.

Tableau 9: Valeur de ' a ' correspondant aux différentes conformations du polymère

Valeur de a	0	0.5	0.8	0.8-2	2
Type de conformation	sphère	Pelotes statistiques	Chaîne en solution	Vermiculaire	Bâtonnet rigide

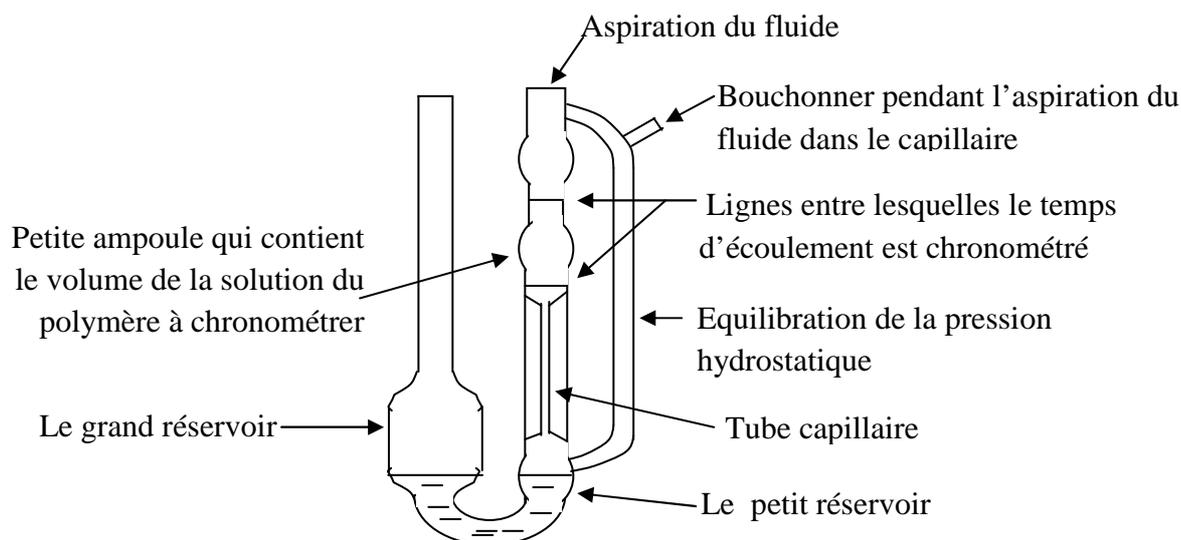


Figure 16: Schéma du viscosimètre Ubbelohde

Selon plusieurs auteurs, le chitosane est parfaitement soluble dans des acides dilués tel que l'acide acétique, l'acide formique, l'acide lactique, l'acide citrique et l'acide chlorhydrique. Et pour déterminer sa masse viscosimétrique, les constantes reliées à l'équation de Mark-Houwink décrivant le système polymère-solvant-température, sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 10: Les différents solvants et constantes reliées à l'équation de Mark-Houwink

<i>Solvant</i>	<i>K (ml/g)</i>	<i>a</i>	<i>Température</i>	<i>Type de viscosimètre</i>	<i>Références</i>
Acide acétique à 5% /KCl à 0,1 M	$1,38 \cdot 10^{-4}$	0,85	$25 \pm 0,1^\circ\text{C}$	Ostwald	[77]
Acide acétique à 0,1M /NaCl à 0,2 M	$1,81 \cdot 10^{-3}$	0,93	$25 \pm 0,1^\circ\text{C}$	Ubbelohde	[78]
Acide acétique à 0,2M /acétate de sodium à 0,1M	$1,64 \cdot 10^{-30}$ *DD ¹⁴	$-1,02 \cdot 10^{-2}$ *DD +1,82	$30 \pm 0,5^\circ\text{C}$	Ubbelohde	[48]
Acide acétique à 0,5M / acétate de sodium à 0,2M	$3,5 \cdot 10^{-4}$	0,76	$25 \pm 0,1^\circ\text{C}$	Ostwald	[79]
Acide acétique à 5% /KCl à 0,1 M	$8,93 \cdot 10^{-4}$	0,71	$25 \pm 0,1^\circ\text{C}$	Ostwald	[77]
Acide acétique à 0,5M / acétate de sodium à 0,2M	$3,2 \cdot 10^{-4}$	0,76	25°C	Ubbelohde	[80]

Nous avons choisi d'utiliser comme solvant l'acide acétique à 0,1M /NaCl à 0,2 M. Les concentrations des solutions du chitosane préparées varient de 0.01g/dl à 0.04g/dl. La sensibilité de cette méthode requière une homogénéité parfaite de la solution (les chaînes du chitosane doivent occuper le maximum de volume pour permettre une bonne élution). A cet effet, la dissolution est menée pendant une semaine. Puis on a filtré en utilisant un papier filtre de porosité 1 μm . Les mesures de viscosités relatives sont déterminées dans un tube capillaire de type Ubbelohde, avec des constantes caractéristiques du couple (polymère-solvant) : $K=1,81 \cdot 10^{-3}$ ml/g et $a= 0.93$ à une température de $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

I.4 Détermination du degré de désacétylation (DD) du chitosane

Les méthodes choisies pour la détermination du degré de désacétylation sont le titrage potentiométrique (ou volumétrique) et la spectrométrie infrarouge (FTIR).

I.4.1 Détermination du degré de désacétylation du chitosane par la méthode du titrage potentiométrique

La détermination du degré de désacétylation par la méthode potentiométrique a été faite suivant un titrage acido-basique modifié par **X. Jiang et al [56]**. A cet effet 0,3g de chitosane est dissous dans 25 ml d'une solution de HCl à 0,1042 M pendant 4h auxquels on ajoute 100 ml d'eau distillée.

Une quantité calculée de KCl est ajoutée à la solution, pour ajuster sa force ionique à 0.1. Cette quantité est calculée en utilisant la formule suivante:

$$I = \frac{1}{2} \sum Z_i^2 C_i \dots\dots\dots[18]$$

La méthode consiste à réaliser un titrage acido-basique dont le titrant est une solution qui contient un mélange de NaOH 0,1025 M et KCl 0,1 M.

La modification portée par X. Jiang et al consiste à fixer l'intervalle du pH, dans lequel le titrage sera effectué entre 2 et 6 puisque au delà du pH 6 le chitosane précipite.

La mesure du pH est effectuée par un pH-mètre type HANNA instruments pH 209. Le tracé représentant les valeurs du pH, en fonction du volume de la solution NaOH ajoutée, permet de déterminer les volumes de la solution de NaOH ajoutés aux deux points d'équivalence.

Le degré de désacétylation est déterminé par la formule proposée par **Avadi M.R et al [48]**:

$$DD = 16.1 * \frac{Y - X}{w} * f \dots\dots\dots[19]$$

Avec :

Y et X sont les volumes de la solution de NaOH consommés aux points d'équivalence (ml)

f : est la molarité de la solution de NaOH (mol/l)

w : la masse utilisée du polymère (g).

I.4.2 Détermination du degré de désacétylation du chitosane par la spectrométrie infra rouge (FTIR)

La spectrométrie IR est la technique la plus répandue pour la détermination du DD. Cette analyse permet d'obtenir les empreintes spectrales vibrationnelles des groupements constituant une molécule.

Il est possible par cette méthode de déterminer le degré de désacétylation par la formule suivante qui est proposée par **Fernandez Cervera et al [53]** :

$$DD\% = 87.8 - \left[3 \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \right] \dots\dots\dots [20]$$

Où : A_{1655} = absorbance de la bande 'amide I' de l'amide secondaire.

A_{3450} = absorbance de l'hydroxyle du groupement CH_2OH .

87.8 = Coefficient de correction de la ligne de base.

I.5 Etude de la solubilité du chitosane dans l'acide acétique

I.5.1 Effet de la concentration

Le chitosane est soluble dans les solutions acides diluées tel que l'acide acétique, grâce aux groupements ammoniums formés après protonation de la fonction amine, qui facilitent la dissolution de la molécule.

Afin d'étudier l'effet de la concentration de l'acide acétique sur la dissolution du chitosane, une série de solutions de 25ml à différentes concentrations de l'acide (0.1, 0.3, 0.5, 1 et 2) mol/l sont préparées, dans lesquelles on dissout une masse de 0.04g du chitosane synthétisé et commercial, sous agitation magnétique à la température ambiante. Les solutions du polymère ont été filtrées sous vide à l'aide d'un papier de type whatman de porosité $1\mu\text{m}$, ensuite les résidus obtenus seront séchés à l'étuve pendant 24h. Les fractions insolubles seront pesées après séchage, leurs poids (m) permettent de calculer les taux de solubilité avec la formule proposée par **Mohy Eldin et al [81]** ci-dessous.

$$\text{Taux de solubilité} = 1 - \left[\frac{\text{poids de la fraction insoluble}}{\text{poids total de l'échantillon}} \right] \% \dots\dots\dots [21]$$

Le tracé du taux de solubilité en fonction de la concentration de l'acide acétique, donne la courbe de solubilité du chitosane dans cet acide.

I.5.2 Effet du pH

Les mêmes quantités des deux polymères ont été dissoutes dans 25 ml d'acide acétique à 0,1M et à différents pH (3, 4, 5, 6, 7 et 8).

Après filtration comme décrit dans l'étape précédente et séchage à l'étuve à 50°C pendant 24h, la fraction insoluble (m) est déterminée et le taux de solubilité est calculé en utilisant la précédente formule de **Mohy Eldin et al [81]**.

Le tracé du taux de solubilité en fonction du pH des solutions d'acide acétique donne la courbe de solubilité du chitosane à différents pH.

I.6 Etude de l'activité antibactérienne du chitosane

I.6.1 Mode opératoire

Pour mener à terme l'étude sur l'activité antibactérienne vis-à-vis des germes de souche *Staphylocoque aureus* (S220), trois concentrations massiques des deux types de chitosane (synthétisé et commercial) ont été considérées, à savoir des concentrations de 0.5%, 1% et 1.5% préparées par dissolution dans l'acide acétique à 1% (w/v) à deux valeurs de pH, 5.8 et 6.2. Ces souches, que nous a fournis gracieusement le laboratoire de microbiologie de l'université de Bejaia, ont été étudiées au moyen de la technique de diffusion en gélose (Muller Hinton) par la méthode des puits. A cet effet, plusieurs formulations ont été préparées avec un même volume $V=20 \mu\text{l}$ du principe actif 'tobramycine' de concentration 0,3%, auquel on a additionné différents volumes des deux polymères, à savoir 10, 20 et 30 μl , préalablement injectés dans les puits. Nous avons procédé, en suivant les mêmes étapes et avec les mêmes quantités en volume et concentration, lors de la réalisation de ces tests microbiologiques, soit sur le polymère seul ou bien sur le principe actif seul.

Toutefois, un essai avec un disque d'antibiotique de tobramycine (10 μ g, Code NN10 réf 5484), a été réalisé afin de nous servir de témoin. Les différentes quantités et volumes étudiés à des pH=5,8 et 6,2 sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 11: Quantités et volumes de polymère injectés dans les puits

<i>Polymères</i>	<i>Chitosane synthétisé</i>			<i>Chitosane commercial</i>			<i>Tobramycine</i>
<i>Concentrations % massique</i>	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,3
<i>Volume déposé dans les puits (μl)</i>	10	10	10	10	10	10	20
	20	20	20	20	20	20	20
	30	30	30	30	30	30	20

I.6.2 Préparation de la suspension bactérienne

A partir d'un tube de conservation, on repique quelques colonies sur gélose nutritive dans le but d'obtenir des souches jeunes. Après incubation à 37°C pendant 24h, on prélève trois colonies et on les dissocie dans 3ml d'eau physiologique. Ce qui constitue notre suspension bactérienne.

I.6.3 Tests d'activité

On prépare des boîtes de Pétrie stérilisées dans un four pasteur à 180°C pendant 30min, dans lesquelles on verse environ 20ml de la gélose Muller Hinton. Puis on ensemence par inondation avec 1ml de la suspension bactérienne,

- Pour le test témoin, le disque d'antibiotique est déposé délicatement dans la boîte de Pétrie,
- Pour les autres formulations, des puits ont été réalisés sur la gélose ensemencée à l'aide d'une pipette pasteur stérile, et les quantités décrites précédemment dans le tableau précédent sont déposées. Les boîtes sont mises à diffuser pendant 2h à la température ambiante puis incubées à 37°C pendant 24h.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne est basée sur l'apparition de zones d'inhibition, dont le diamètre est mesuré en millimètres (mm).

I.7 Préparation de formulations de la tobramycine/chitosane à différentes concentrations et pH

I.7.1 Protocole expérimental

Pour préparer les formulations du principe actif et du polymère (tobramycine/chitosane), on a adopté la méthode de gélification ionique du chitosane, au moyen du polyanionique tripolyphosphate de sodium (STPP ou TPP) $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, proposée par **Calvo et coll [82]**. L'idée de concevoir ces nouvelles formulations, a pour objectif de contrôler la vitesse de libération de la tobramycine à travers la matrice polymérique et d'améliorer sa biodisponibilité, par rétention du principe actif en question au sein de la matrice polymérique. Et comme le chitosane, est connu pour ses propriétés d'adhésion aux muqueuses par formation de liaisons, entre la charge positive du groupement amino et la charge négative portée par l'acide sialique, existant dans la mucine, principal constituant de la muqueuse. Son utilisation par voie ophtalmique, est un choix ciblé car l'un des problèmes majeurs rencontré avec les formes liquides à administration oculaire (collyres), est la rapidité de leurs évacuations après instillation par gouttelettes dans l'œil, d'abord par les paupières où une grande fraction du liquide est perdue, puis à travers les canaux lacrymaux qui finissent dans les fosses nasales. En conséquence la guérison de l'organe atteint est retardée.

Ces formulations sont préparées suivant le protocole expérimental suivant :

- a. Tamisage : Afin d'avoir une granulométrie homogène on fait passer la poudre du chitosane synthétisé dans un tamis en acier inoxydable d'ouverture de maille de $100\mu\text{m}$,
- b. Dissoudre les chitosanes synthétisé et commercial dans de l'acide acétique à 1% à différentes concentrations ; 2mg/ml et 4mg/ml dans un volume de 10ml. Puis ajuster leurs pH à 5 et à 6,
- c. Ajouter 1ml de tobramycine à une concentration de 0.3%, dissout préalablement dans de l'eau distillée, dans la solution du polymère maintenue sous agitation magnétique continue pendant 20mn,
- d. Ajouter le polyéthylène glycol d'une masse 6000kDa (PEG6000) et le surfactant Tween80, suivant les concentrations et les quantités indiquées dans le tableau 12, dans la précédente solution, et maintenir l'agitation pour 20mn,
- e. Ajouter 5ml de la solution du TPP (comme second tensioactif) dissout dans de l'eau distillée à 1mg/ml, aux différentes solutions préparées sous agitation ultrasonique pendant 2mn à la température ambiante,
- f. Récupérer les nanoparticules par centrifugation à 5800 tr/mn pendant 1h,

g. Les nanoparticules obtenues sont lavées avec de l'eau distillée jusqu'à la neutralité, puis séchées à l'air ambiant.

Tableau 12: Quantités et volumes ajoutés des différents réactifs aux formulations

Formulations	Concentration du CH (mg/ml)		pH	Tobramycine à 0.3% (ml)	PEG à 30mg/ml (ml)	Tween 80 (μ l)
	Synthétisé	commercial				
F1	2	2	5	1	0	0
F2	2	2	5	1	1	0
F3	2	2	5	1	1	300
F4	4	4	5	1	0	0
F5	4	4	5	1	1	0
F6	4	4	5	1	1	300
F1	2	2	6	1	0	0
F2	2	2	6	1	1	0
F3	2	2	6	1	1	300
F4	4	4	6	1	0	0
F5	4	4	6	1	1	0
F6	4	4	6	1	1	300

I.7.2 Cinétique de diffusion

Afin de suivre la libération contrôlée de la tobramycine dans l'eau physiologique, la dissolution est l'approche la plus recommandée pour valider l'effet retard recherché. Cette étude consiste en la comparaison du profil de diffusion (coefficient de diffusion) de la tobramycine, dans les différentes formulations élaborées. Cet essai s'inscrit dans la pharmacopée comme étant une simulation du contrôle de la biodisponibilité d'un médicament *in vitro*. Cet essai permet aussi de mesurer la vitesse de diffusion du principe actif à travers la matrice polymérique dans le compartiment oculaire (à pH=7.4).

I.7.3 Préparation du milieu physiologique

Afin de simuler le milieu physiologique oculaire, une solution de larmes artificielles a été préparée. A cet effet, une masse de 140mg du chlorure de sodium (NaCl) est dissoute dans 10ml d'eau distillée, puis le pH est ajusté à 7.4 avec une solution de NaOH à 0.01M.

I.7.4 Essai de dissolution du principe actif et contrôle cinétique par densité optique

Les différentes formulations préparées sont introduites dans la solution décrite précédemment. Des prélèvements ont été effectués après un temps donné, puis dosé par spectrophotométrie UV-Visible par un appareil de type Spectro Scan 50 à une longueur d'onde de 204nm correspondant à l'absorption du groupement amino présent dans la molécule de tobramycine.

I.8 Techniques de caractérisation des échantillons

I.8.1 La spectrométrie infra rouge (FTIR)

La spectrométrie IR constitue une méthode de choix pour l'analyse à la fois qualitative et quantitative de substances chimiques. Elle permet de connaître les différents groupements fonctionnels présents dans une molécule. Elle est fondée sur l'absorption des photons « $h\nu$ » émis par une radiation très peu énergétique, permettant de modifier l'énergie de vibration des molécules. Il est à noter que l'infrarouge est une méthode spectroscopique non destructive de l'échantillon analysé.

Le spectre IR est étudié dans une gamme de fréquence allant de 400 à 4000 cm^{-1} , les bandes les plus caractéristiques se distinguent dans trois régions différentes :

- 4000 cm^{-1} à 1500 cm^{-1} : contient des bandes d'allongement correspondant aux principaux groupements OH, CO, NH₂ etc.
- 1500 cm^{-1} à 600 cm^{-1} : c'est une région complexe appelée « empreinte digitale » du composé dans laquelle se situe de nombreuses vibrations de déformations ainsi que des bandes d'allongement des liaisons CO tel que les esters, éthers et alcools.
- 1000 cm^{-1} à 600 cm^{-1} : c'est une zone très utilisée pour la détermination des structures éthyliques et aromatiques, grâce aux déformations hors du plan des liaisons CH et à des déformations du cycle.

Il est par conséquent possible et intéressant à la fois d'exploiter cette méthode, pour mettre en évidence des interactions susceptibles d'être établies dans un mélange, entre les différents

composants. Dans notre étude, nous avons utilisé l'analyse FTIR (infrarouge à transformée de Fourier) pour caractériser les chitosanes synthétisé et commercial, la tobramycine ainsi que les différentes formulations préparées. Le principal but est de déceler d'éventuelles interactions entre les deux constituants. Nous avons utilisé un spectrophotomètre infrarouge de marque Shimadzu et de modèle IR Affinity-1. Des pastilles de KBr ont été préparées par la compression de 2-3mg des différents échantillons mélangés séparément à 37mg de KBr étuvé à 60°C pendant 24h. Le spectre infrarouge de chaque échantillon est enregistré à la température ambiante, dans une plage de 400 à 4000cm⁻¹ avec une résolution de 4cm⁻¹ et une accumulation de 25scans pour chaque spectre enregistré.

I.8.2 Analyse thermogravimétrique (ATG-DTG)

La thermogravimétrie est une technique permettant de mesurer de très faibles variations de masses d'un échantillon solide pulvérisé, sous l'action d'un gradient de température, par balayage dans une gamme de température donné. L'utilisation de différents gradients de température, permet d'observer les processus de dégradation et de transformations de phases, propres à chacun des constituants sous atmosphère d'azote (N₂). Cette analyse est réalisée sur des échantillons de la chitine, chitosane (synthétisé et commercial) et la tobramycine, en utilisant un appareil ATG-ATD de marque SETARAM et de type TG DATA92, avec une vitesse de chauffe de 10C°/mn et un flux de gaz d'azote à débit constant.

I.8.3 Diffraction des rayons X (DRX)

Cette technique permet de déterminer les distances inter-réticulaires des différents plans de diffraction et l'arrangement des atomes dans les réseaux cristallins. Comme les rayons X sont diffractés de manière distincte, par les éléments du réseau caractérisé par un empilement bien défini de ce dernier, l'irradiation de la matière par rayons X permet de connaître sa nature cristallographique. L'angle (2 θ) de diffraction dépend de l'énergie du rayonnement incident, de son orientation par rapport à la surface balayée par le faisceau, ainsi que de la distribution spatiale des atomes (structure cristalline). Le spectre de diffraction constitue une empreinte caractéristique des structures cristallines analysées. Les mesures sont effectuées avec un appareil, constitué par un tube émetteur de rayons X qui irradie un échantillon, lequel diffracte une partie d'un rayonnement

émis vers un système de détection. Les spectres de diffraction peuvent être obtenus par différentes méthodes à rayon RX, soit directement à partir d'un fragment solide ou un cristal de taille plus ou moins importante (méthode de Weissenberg, cristal tournant), ou sur de petites quantités de poudre finement broyée (50 μ m) par diffractomètre de poudre selon deux montages : Bragg-Brentano ou Debye-Scherrer. Le schéma d'un diffractomètre le plus usuel est représenté sur la figure suivante :

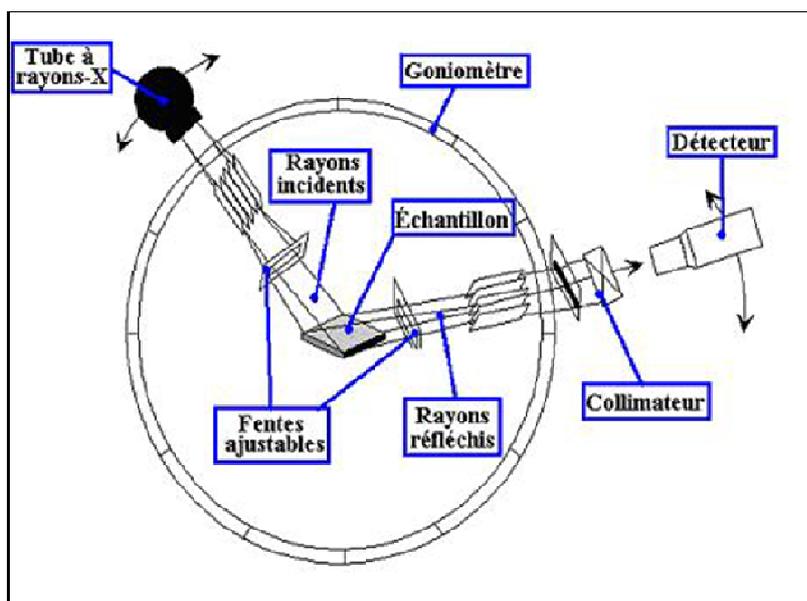


Figure 17 : Schéma d'un diffractomètre de poudre de diffusion des Rayons X

L'émission des rayons X est effectuée sur un appareil de type PANalytical **PW1050** en utilisant la raie $K\alpha$ du Cuivre de longueur d'onde de $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$, à la température ambiante pour une gamme de 2 θ comprise entre 0 et 70°. Le pas est de 0.02° avec un temps de mesure de 2s/pas.

I.8.4 Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

La microscopie électronique est une technique basée sur le principe des interactions électrons-matière, capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon. Un faisceau d'électron focalisé est dévié à travers des lentilles électromagnétiques, balaie la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réfléchit les différents faisceaux d'électrons (électrons rétrodiffusés). Une partie du faisceau est absorbée par les atomes des différents éléments composant la couche superficielle de l'échantillon. Cette absorption conduit à une dispersion d'énergie par une

série d'émissions électroniques appartenant au domaine des rayons X secondaires, d'énergies propres à chaque élément ; Energy Dispersive X-ray spectrometry (EDX) (figure 18). Cette propriété est exploitée lors de la microanalyse en utilisant une sonde EDX (MEB couplé à l'EDAX).

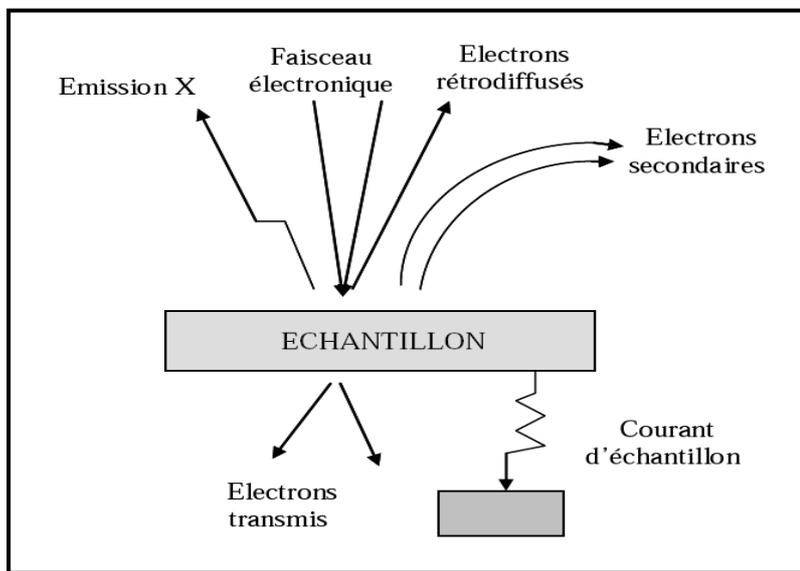


Figure 18: Représentation schématique des interactions faisceau-surface d'échantillon

Chaque type d'électron est recueilli sélectivement, c'est-à-dire que lorsque le faisceau d'électron bombarde la surface bien polie, une partie des électrons la traverse, le reste est réémis sous forme d'électrons secondaires. Ces derniers sont analysés par différents détecteurs et qui permettent de reconstruire une image spéculaire en trois dimensions de la surface.

Les observations effectuées par le MEB peuvent générer des informations telles que :

- La topologie ou relief de la surface d'un échantillon ;
- La morphologie, la forme et la taille de différents composants, la porosité de l'échantillon ;
- La composition élémentaire qualitative, les concentrations relatives d'éléments chimiques de la surface de l'échantillon et leur distribution dans ses différentes phases.

Le microscope électronique à balayage utilisé est de marque FEI de modèle Quanta 200 avec le mode environnemental (ESEM).

Cette technique à été utilisée pour observer la morphologie et la composition chimique des deux chitosanes avec lesquels on a travaillé, le synthétique et le commercial, le principe actif qui est la tobramycine ainsi que les nanoparticules formées par les polymères cités précédemment.

I.8.5 Caractérisation texturale

La texture d'un solide précise la morphologie interne des particules qui le composent, c'est-à-dire l'existence des pores ou espaces vides à l'intérieur du solide. Elle est définie par sa surface spécifique, son volume poreux total, la forme et la taille de ses pores et la distribution poreuse. La connaissance de ces caractéristiques est particulièrement importante pour expliquer la capacité d'adsorption d'un matériau.

I.8.5.1 Isothermes d'adsorption et de désorption d'azote à 77K

La caractérisation de la texture des matériaux repose essentiellement sur les isothermes d'adsorption et de désorption d'azote à 77K. Pour réaliser ces isothermes, une technique volumétrique classique est employée. L'appareil utilisé est du type Quantachrome Nova 200e.

L'analyse par la méthode volumétrique est basée sur la détermination des quantités de gaz adsorbée sur l'échantillon en fonction de la pression d'équilibre. Avant d'effectuer toute adsorption, la surface des échantillons étudiés doit être débarrassée de toute espèce retenue par adsorption physique (molécules d'eau, dioxyde de carbone, ...). Ces espèces sont éliminées par dégazage sous vide à une température donnée. Dans notre étude, le dégazage des deux matériaux (formulations F3 pour le chitosane synthétisé à pH=5 et 6) est réalisé à une température de 50 °C pendant six heures. Cette opération doit être effectuée très soigneusement pour obtenir des résultats reproductibles.

L'isotherme d'adsorption est déterminée par l'introduction séquentielle de quantités connues de gaz d'adsorption (l'azote) dans le porte échantillon. A chaque étape, l'adsorption du gaz par l'échantillon se produit et la pression dans le volume isolé chute jusqu'à ce que le gaz adsorbé et le gaz restant soient en équilibre. L'application de la loi de Boyle-Mariotte permet de déterminer la quantité d'azote adsorbée pour chaque pression d'équilibre, par différence entre la quantité de gaz introduite initialement et celle restante en équilibre. A une température donnée, l'ensemble des états d'équilibre correspondant à des pressions comprises entre 0 et la pression de vapeur saturante de l'adsorbat est appelé isotherme d'adsorption. Celle-ci est représentée graphiquement en reportant la quantité du gaz adsorbée par gramme d'adsorbant en fonction de la pression relative (rapport de la pression d'équilibre du gaz et de sa vapeur saturante).

L'allure de ces isothermes nous renseigne sur la texture poreuse du matériau. Selon la classification établie par l'IUPAC (Union internationale de chimie pure et appliquée), il existe six types d'isothermes d'adsorption (figure 19).

- L'isotherme d'adsorption du **type I** est caractérisée par l'existence d'une horizontale traduisant la formation d'une couche monomoléculaire sur un solide microporeux (le rayon des pores est inférieur à 25 Å).
- L'isotherme d'adsorption du **type II** est caractérisée par une augmentation très progressive de la quantité adsorbée en fonction de la pression relative. Cette isotherme est obtenue avec des adsorbants non poreux ou macroporeux (le rayon des pores est supérieur à 500 Å). On observe à la surface de ces solides la formation des couches adsorbées s'épaississant progressivement. On dit que l'isotherme d'adsorption du type II est caractéristique d'une adsorption multimoléculaire (multicouches).
- L'isotherme d'adsorption du **type IV** a la même allure que l'isotherme d'adsorption du type II pour des pressions relatives les plus basses. Pour les pressions relatives les plus élevées, elle est caractérisée par un palier de saturation dont la longueur est très variable (parfois réduit à un point d'inflexion). Cette isotherme d'adsorption est obtenue avec des adsorbants mésoporeux (le rayon des pores est compris entre 25 et 500 Å) dans lesquels se produit une condensation capillaire.
- Les isothermes d'adsorption du **type III** et **V** sont très rares : elles diffèrent des isothermes d'adsorption du type II et IV aux pressions relatives les plus faibles. Ce changement de courbure du début de l'isotherme d'adsorption est interprété par le fait que les interactions adsorbant/adsorbat sont faibles.
- L'isotherme d'adsorption du **type VI** présente des marches caractéristiques d'une adsorption multicouche sur une surface non-poreuse très homogène. Ce type d'isotherme est rarement observé.

Il est très important de souligner qu'il s'agit d'une classification qui vise à distinguer les adsorbants typiques. En réalité, les isothermes d'adsorption obtenues sont généralement des isothermes d'adsorption composites révélant la complexité des adsorbants étudiés.

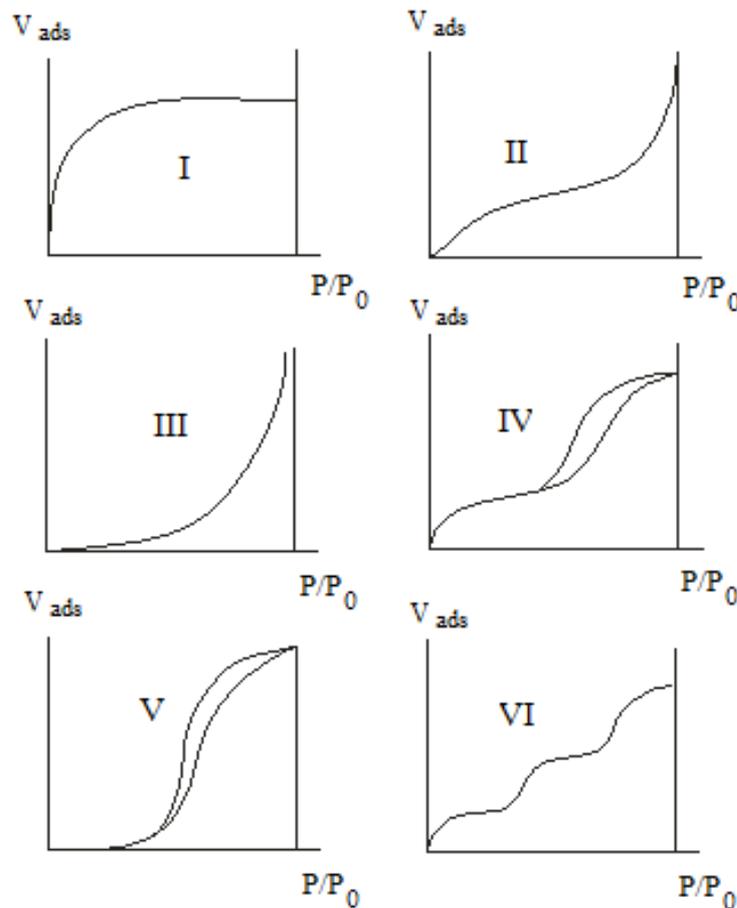


Figure 19: Différents types d'isothermes d'adsorption des gaz selon IUPAC

Après avoir atteint la saturation ($P/P_0 = 1$), en déterminant les volumes de vapeur restant adsorbée sur le solide pour les valeurs de pressions relatives (p/p_0) décroissantes, on peut obtenir l'isotherme de désorption [83].

I.8.5.2 Exploitation des isothermes d'adsorption et de désorption d'azote pour l'étude de la texture des matériaux

Cette étude a pour but l'exploitation de ces isothermes d'adsorption et de désorption d'azote en vue de déterminer les caractéristiques texturales et poreuses des matériaux, à savoir; la surface spécifique, le volume poreux total, le rayon moyen des pores et la porosité en appliquant la loi de BET (**B**runauer, **E**mmett et **T**eller).

Pour une description complète de la texture du solide, il est souvent intéressant de connaître la manière dont le volume poreux et la surface spécifique se répartissent entre les pores des différents rayons.

Le procédé de détermination que nous avons utilisé est celui de Barret, Joyner et Halenda, appelé communément la méthode BJH. Cette méthode suppose que la forme des pores présents dans le solide est cylindrique. Une étude comparative entre la surface spécifique BET (S_{BET}) et la surface cumulée obtenue par la méthode BJH (S_{cum}) peut nous fournir certaines indications supplémentaires sur la forme des pores présents dans le matériau :

- Si $S_{cum} > S_{BET}$, les pores peuvent être cylindriques fermés à une extrémité, ou être ouverts aux deux extrémités et posséder des parties de section importante séparées par des étranglements ; ils peuvent également être en forme de bouteille.
- Si $S_{cum} < S_{BET}$, les pores contiennent de nombreuses cavités sphéroïdales. De plus, une différence importante peut être due à la présence de micropores dans le solide.
- Si $S_{cum} \approx S_{BET}$, les pores sont de formes tubulaires ouverts aux deux extrémités [84].

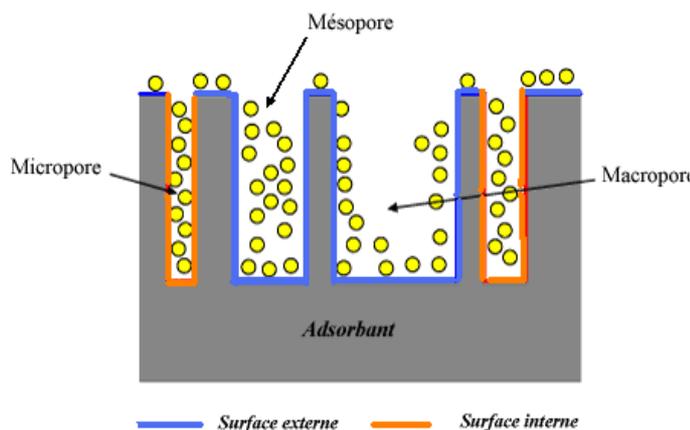


Figure 20: Représentation schématique des

Afin de démontrer que le matériau contient des micropores ou des mésopores on utilise la méthode proposée par Lippens et De Boer qui consiste à tracer une courbe V_{ads} en fonction de l'épaisseur t (thickness) statique de la couche multimoléculaire adsorbée. La courbe ainsi obtenue, appelée courbe transformée t , peut prendre les trois formes représentées sur la figure 21.

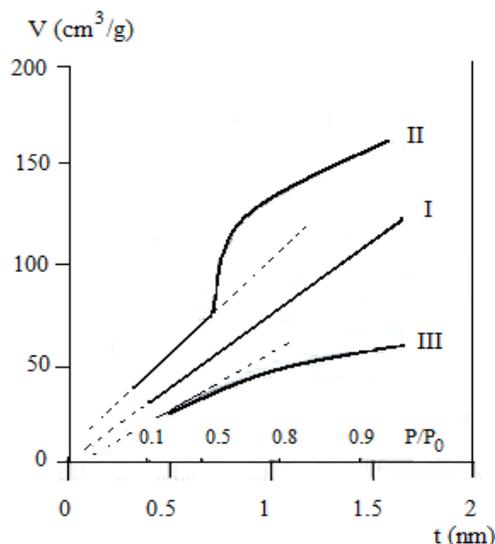


Figure 21: Les trois formes possibles du diagramme-t les plus rencontrées pour l'adsorption de l'azote sur les solides

Dans le premier cas (**forme I**), la courbe transformée t est une droite passant par l'origine dans tout le domaine des pressions relatives. Cette courbe est caractéristique d'un adsorbant non poreux.

Lorsque l'adsorbant est mésoporeux (**forme II**), la courbe transformée t est une droite tant qu'il n'y a pas eu de condensation capillaire; à partir d'une certaine valeur de la pression relative, la quantité adsorbée est plus importante que celle qui serait nécessaire pour former une couche d'épaisseur t.

Lorsque l'adsorbant est microporeux (**forme III**), la courbe transformée t n'est plus une droite tant que les micropores se remplissent ; lorsque les micropores sont saturés, il n'y a plus d'adsorption et la courbe transformée devient une droite horizontale.

L'épaisseur du film adsorbé dans le cas de l'azote est tirée à partir de la relation de De Boer :

$$t(\text{Å}) = \left[\frac{13,99}{0,034 - \log \frac{P}{P_0}} \right]^{0.5}$$

TROISIEME PARTIE: RESULTATS & DISCUSSIONS

I. Caractérisation du chitosane ————— 75

**II. Caractérisation de la tobramycine et étude
antibactérienne ————— 97**

III. Cinétique de libération de la tobramycine ——— 107

I. Caractérisation du chitosane

I.1 Extraction de la chitine et sa transformation par voie chimique en chitosane

- **Rendements des réactions**

Pour extraire la chitine à partir des déchets des crevettes, on a utilisé une masse de 40g de poudre sèche, qui a été traitée avec une solution d'acide chlorhydrique (1M) pendant une nuit sous agitation continue, à la température ambiante pour éliminer les composés minéraux (déminéralisation) qu'elle contient. Ensuite, on a continué l'extraction avec une solution basique d'hydroxyde de sodium à 10% pendant 6h et à une température de 100°C, pour dissocier le complexe chitine-protéines (déprotéinisation).

Par la suite, on a poursuivi le traitement par un blanchiment avec un mélange acétone/ éthanol pour une nuit, puis par un agent oxydant, le peroxyde d'hydrogène, durant 30mn à la température ambiante. Cette étape sert à éliminer les substances colorantes, qui sont la β -carotène. On obtient à la fin du traitement une poudre de couleur blanche qui est la chitine.

Cette dernière a été traitée par une solution basique concentrée d'hydroxyde de sodium à 50% pendant 3h à l'aide d'un chauffage à reflux à 120°C, au profil d'une réaction de désacétylation qui conduit à l'obtention du polymère recherché, le chitosane.

Les résultats des rendements obtenus de chaque étape d'extraction ainsi que l'étape de désacétylation, sont regroupés dans le tableau suivant :

$$\text{Rendement \%} = \frac{\text{masse de l'échantillon avant réaction}}{\text{masse de l'échantillon après réaction}} \dots\dots\dots [22]$$

Tableau 13: Rendements des différentes étapes d'extraction et de transformation de la chitine en chitosane

<i>Etape</i>	<i>Déminéralisation</i>	<i>Déprotéinisation</i>	<i>Blanchiment</i>	<i>Désacétylation</i>
Rendements %	38,564	43,31	96,51	89,53

Le rendement global du processus d'extraction de la chitine puis sa transformation par voie chimique en chitosane est exprimée par la relation;

$$\mathbf{R \text{ (chitosane/exosquelette) = 8,96\%.}}$$

I.2 Détermination de la masse du chitosane par viscosimétrie

La masse moléculaire du chitosane synthétisé et du chitosane commercial, ont été déterminées par l'analyse viscosimétrique dans un tube capillaire type Ubbelohde avec les constantes caractéristiques $K=1,81 \cdot 10^{-3} \text{ ml/g}$ et $a=0,93$ dans un mélange aqueux d'acide acétique à 0,1M /NaCl à 0,2 M à une température constante de 25°C.

La valeur de la constante caractéristique de la conformation du polymère, dans un solvant donné, laisse suggérer que le polymère se trouve sous forme de chaîne plus ou moins ramifiée en solution. Ce qui a rendu sa dissolution plus difficile, étant donné qu'elle a été obtenue seulement après un temps de séjour dans la solution correspondant à 7 jours (une semaine). Les courbes (η_{sp}/C) et $(\ln \eta_r)/C$ en fonction de C permettent de déterminer la viscosité intrinsèque $[\eta]$, qui coïncide avec leur intersection sur l'axe des ordonnées (ordonnée à l'origine), selon la représentation sur les figures suivantes :

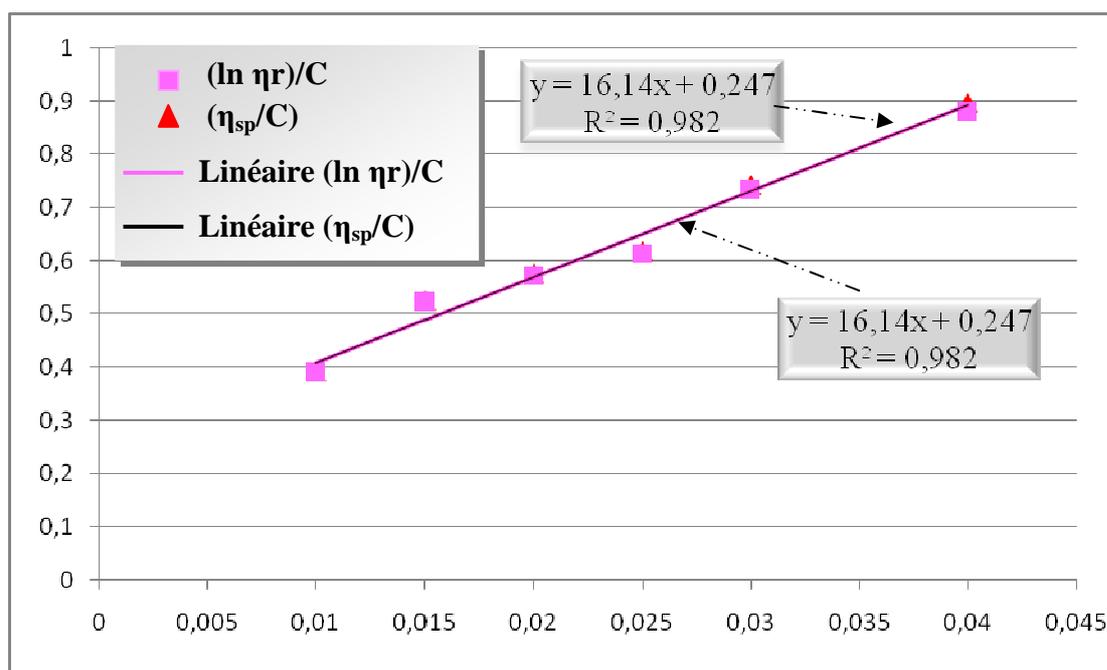


Figure 22: Viscosité du chitosane synthétisé

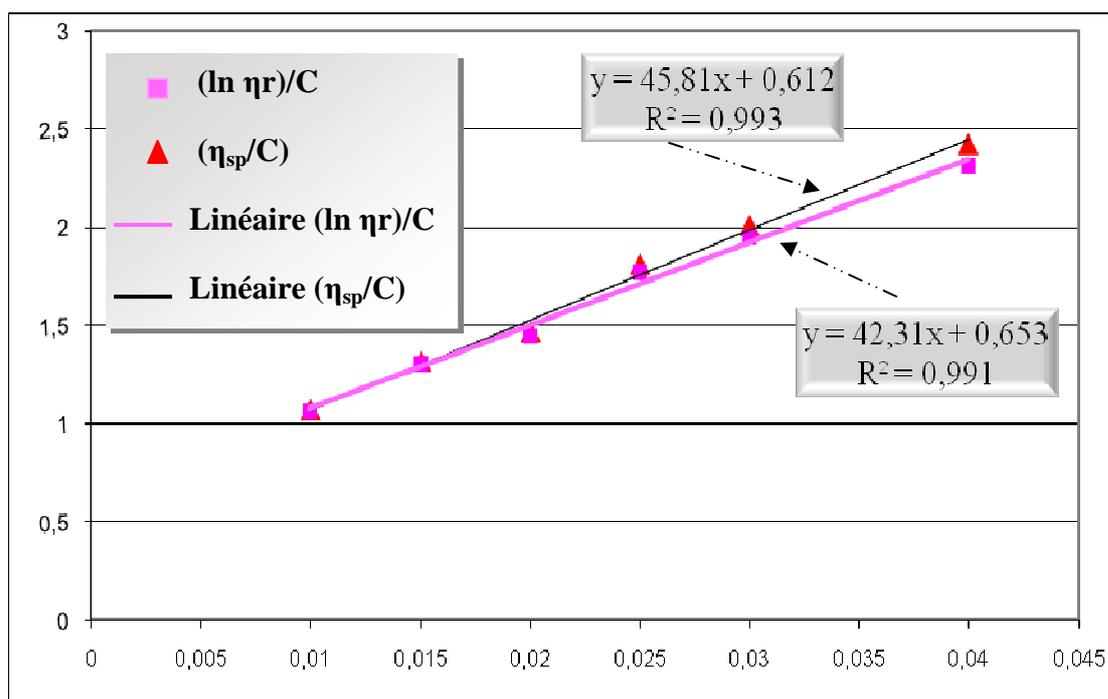


Figure 23: Viscosité du chitosane commercial

A partir des tracés ci-dessus des valeurs (η_{sp}/C) en fonction de C , nous avons déduits les valeurs de la viscosité intrinsèque $[\eta]$ des deux polymères (chitosane de synthèse et chitosane commercial) par extrapolation, qui coïncident avec l'ordonnée à l'origine. L'application de la loi de Mark-Houwink, présentée dans l'équation 17 sous les conditions citées ci-dessus, nous avons déterminé leurs masses moléculaires moyennes M_v , que nous avons regroupé dans le tableau qui suit :

Tableau 14: Valeurs de la viscosité intrinsèque $[\eta]$ et la masse moléculaire moyenne du chitosane synthétisé et commercial

	$[\eta]$ (dl/g)	M_v (Kg/mol)	M_v (kDa)
Chitosane synthétisé	0,247	27,941	27,95
Chitosane commercial	0,612	74,126	74,518

I.3 Détermination du degré de désacétylation du chitosane

I.3.1 Détermination du degré de désacétylation du chitosane par la méthode du titrage potentiométrique

Le degré de désacétylation est calculé en comparant entre le nombre des groupements amino libres (par unité de poids de l'échantillon) et le poids de l'unité glucosamine [36], en utilisant l'équation 19 proposée par Avadi M.R et al [48].

a) Chitosane synthétique

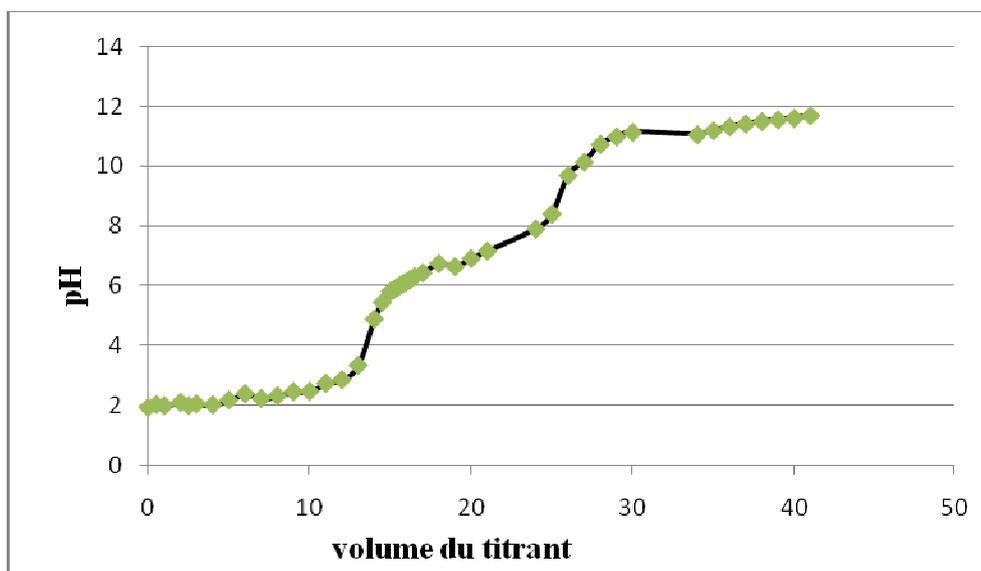


Figure 24 : Courbe de titrage potentiométrique du chitosane synthétisé

b) Chitosane commercial

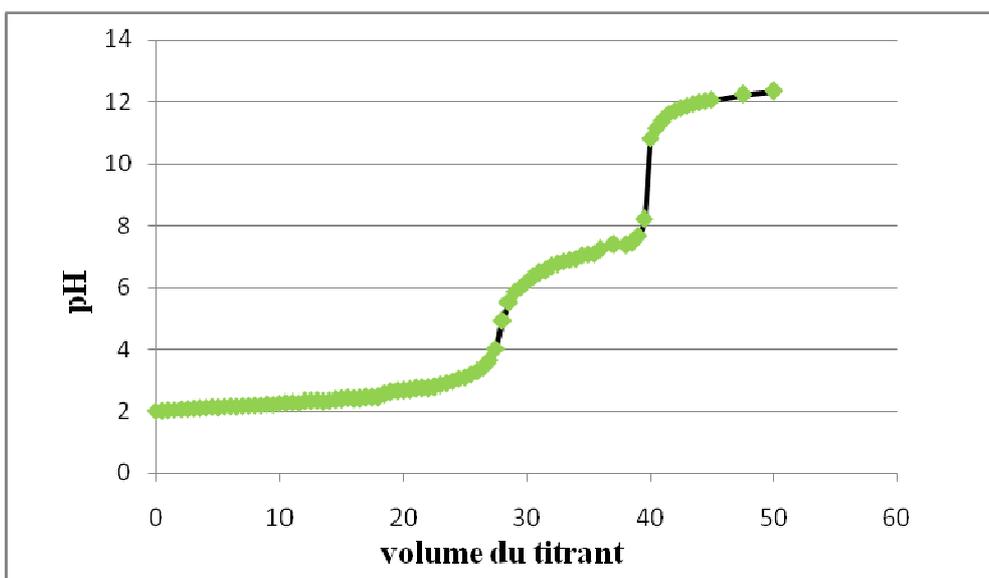


Figure 25: Courbe de titrage potentiométrique du chitosane commercial

A partir de ces figures, nous avons tiré les valeurs de X et Y, qui sont les volumes (ml) de la solution de NaOH consommés aux points d'équivalence.

Où f : est la molarité de la solution de NaOH (mol/l), $C=0,1025$ M

w : la masse utilisée du polymère (g), $m=0,3$ g

Tableau 15: Valeurs de X, Y et le DD

	<i>X (ml)</i>	<i>Y (ml)</i>	<i>DD %</i>
<i>Chitosane synthétisé</i>	12,5	14,5	88,72
<i>Chitosane commercial</i>	27	32	64,12

I.3.2 Détermination du degré de désacétylation du chitosane par spectrométrie infra rouge (FTIR)

Les valeurs des absorbances des bandes les plus caractéristiques, celle de la fonction amide (bande amide I) par rapport à celle de la fonction OH (alcool), sont utilisées pour la détermination du degré de désacétylation DD, puisqu'elles sont proportionnelles aux concentrations respectives des espèces considérées (loi de Beer-Lambert).

La détermination du DD ou DA ($DD = 1 - DA$) a été décrite par plusieurs auteurs. Elle est fondée sur la comparaison entre l'absorbance d'une bande qui est proportionnelle à la désacétylation (bande amide I mesurée à 1655cm^{-1} , A_{1655}) et à l'absorbance de la seconde

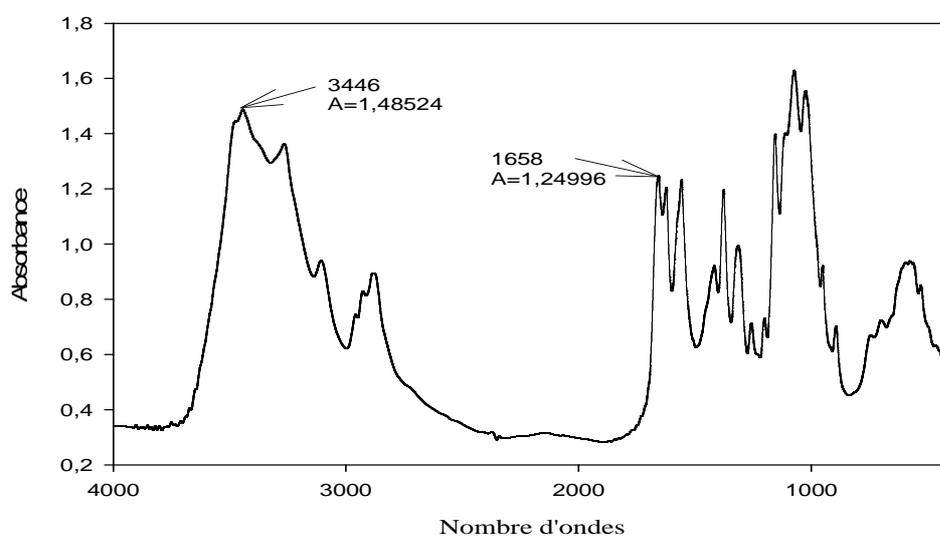


Figure 26 : Spectre IR du chitosane synthétisé

bande qui est indépendante de la désacétylation et qui reste constante, du fait que ce groupement fonctionnel (OH) ne subit pas de modification chimique lors de la formation du chitosane (bande de référence de OH à 3450 cm^{-1} , A_{3450}) [36]. Pour notre étude, les bandes en question et caractéristiques des deux fonctions, sont légèrement décalées de 3 cm^{-1} et 4 cm^{-1} , situées à des fréquences de 1658 et 3446 respectivement. Ces écarts négligeables sont dus aux conditions expérimentales de préparation des échantillons, et probablement même aux différences des poids moléculaires entre ceux des chitosanes étudiés et le poids moléculaire du chitosane de référence.

En utilisant l'équation 20 donnée par **Fernandez Cervera et al** [53], le DD calculé est de **85.27%**, une valeur proche de celle déterminée par la méthode potentiométrique.

I.4 Etude de la solubilité du chitosane dans l'acide acétique

I.4.1 Effet de la concentration

L'étude de l'effet de la concentration de l'acide acétique sur la solubilité des deux polymères, a été réalisée sur des solutions de l'acide en question à différentes concentrations. Les courbes ci-dessous (Figure 27) représentent le taux de solubilité des deux polymères, en fonction des concentrations des solutions d'acide acétique.

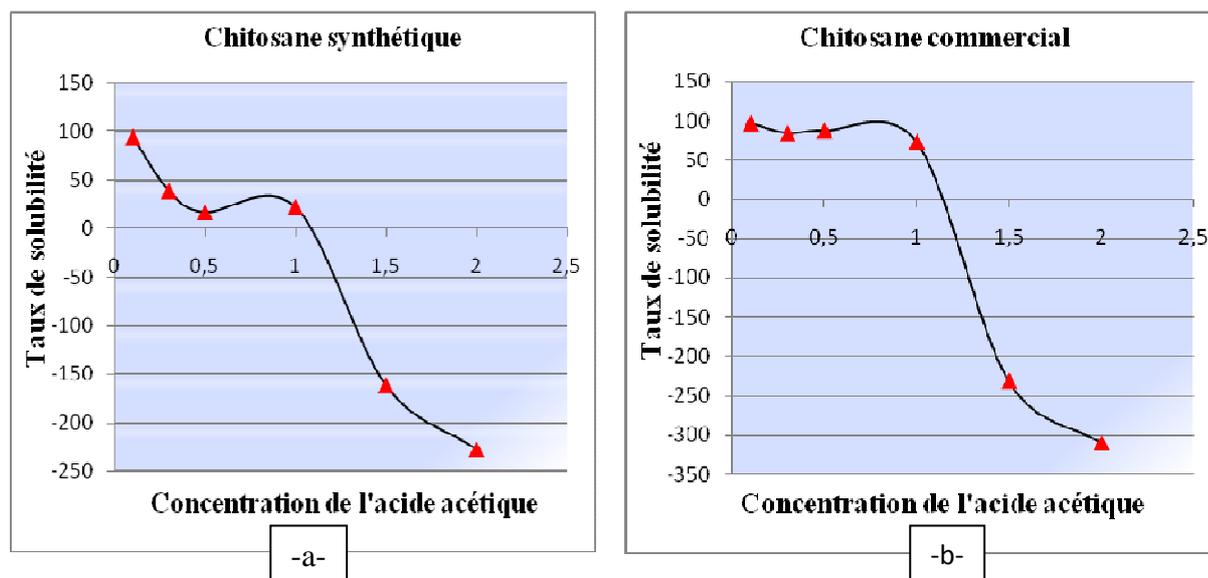
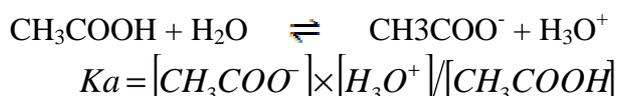


Figure 27 : Taux de solubilité en fonction de la concentration d'acide acétique
a) chitosane synthétique ; b) chitosane commercial

Ces figures montrent que les deux chitosanes (synthétique et commercial) sont solubles à des concentrations d'acides acétiques inférieures à 1 M. Ils atteignent des taux de solubilité très élevés de 93,75 et 97,27 respectivement à une concentration de 0,1M. En effet le chitosane est soluble dans les acides dilués, grâce à la protonation de ses groupes amino (-NH₂) libres suivant l'équilibre acido-basique:



Et ces protons proviennent de la dissociation de l'acide acétique suivant l'équilibre :



Avec K_a : constante de dissociation de l'acide

On remarque que plus la concentration de l'acide est importante plus sa constante de dissociation est faible. Par conséquent il y aura moins de protons H⁺ libérés, ce qui engendre une diminution du taux de solubilité du chitosane.

Quand la concentration de l'acide est supérieure à 1M, la valeur du taux de solubilité calculée est négative. Ce qui explique que la quantité retenue (insoluble) est supérieure à la quantité du polymère dissoute dans ces solutions. Cela est attribué à la non solubilité du polymère d'une part et au piégeage des molécules d'acide entre les chaînes du chitosane.

I.4.2 Effet du pH

Les courbes de solubilité des deux chitosanes (synthétisé et commercial) en fonction du pH, ont été obtenues à partir des solutions de polymères à 0,1M d'acide acétique à différents pH (3, 4, 5, 6, 7 et 8).

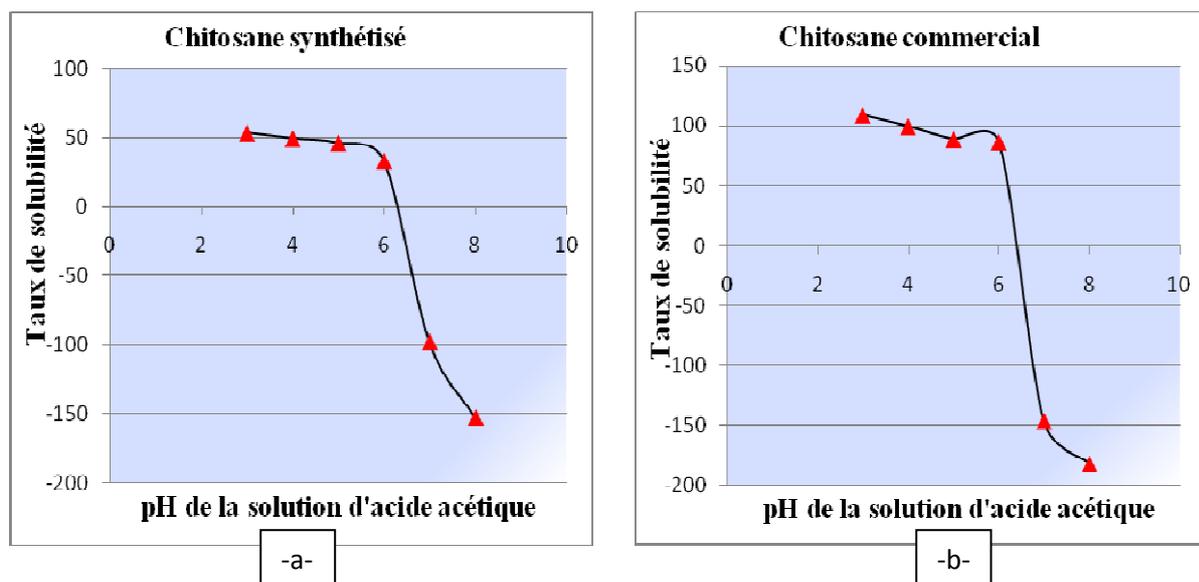


Figure 28: Taux de solubilité en fonction du pH de la solution d'acide acétique
a) chitosane synthétique ; b) chitosane commercial

Puisque dans le domaine $3 \leq \text{pH} \leq 6$, on a la concentration de H_3O^+ élevée et la dissociation de l'acide acétique est plus importante. Donc plus le pH augmente moins l'acide acétique est dissocié. D'où le polymère présente des taux de solubilité faibles avec l'augmentation du pH.

I.5 Caractérisations par spectrométrie infra rouge (FTIR)

Dans ce qui suit, les différents spectres IR des différents échantillons ont été obtenus à différentes étapes du traitement de l'exosquelette.

Les spectres IR de la chitine et du chitosane, représentés dans la figure 29, révèlent l'existence de plusieurs liaisons dont les intensités des bandes d'absorption correspondantes, et leur nature varient d'un échantillon à un autre. L'ensemble des bandes d'absorption attribuées soit au chitosane ou bien à la chitine ainsi que leurs modes de vibration, sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

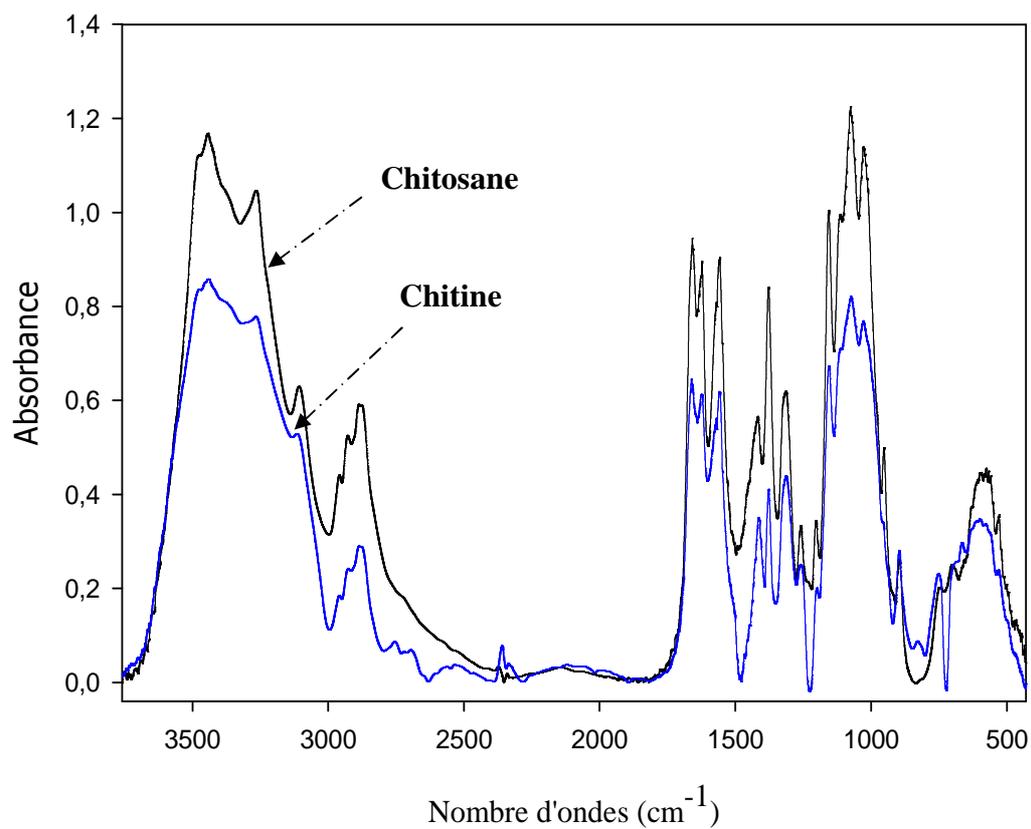


Figure 29: Spectre FTIR de la chitine et de chitosane synthétisé

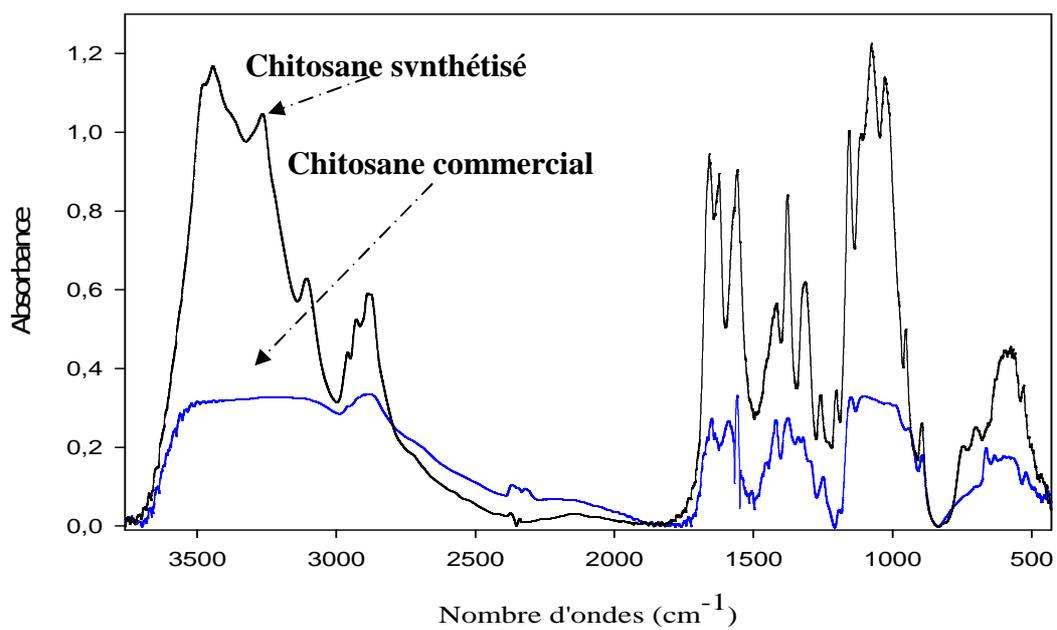


Figure 30: Spectre FTIR des chitosanes synthétisé et commercial

Tableau 16: Principales bandes d'absorption IR du chitosane et leurs groupements attribués

Fréquence (cm^{-1}) données par la littérature [85]	Fréquence (cm^{-1}) enregistrée	Attribution aux liaisons
3290-3380	3265-3200	ν NH _s et as
3300-3650	3446	ν OH
2850-2960	2874-2980	ν CH
1655	1658	ν CO (amide I)
1555	1558	δ NH (amide II)
1406	1417	ν N-C
1379	1378	δ CH ₃ , δ OH
1325	1320	δ CH ₂
1310	1314	δ CH (CH ₃ ou CH ₂)
1265	1261	δ H-N-C
1033 - 1167	1026-1156	ν C-O fortes (superposition d'alcool et éther cyclique)
1030 - 1070	1029	ν C-O et δ OH fortes (alcool primaire -CH ₂ OH)

ν : vibration de valence, δ : vibration de déformation, s : symétrique, as : asymétrique.

Cette technique permet aussi de déterminer l'indice de cristallinité (IC) du chitosane et de la chitine, **Focher B et al [86]** ont rapporté que la cristallinité de ces polymères peut être estimée à partir de leurs spectres IR en comparant l'intensité des bandes à 1379 cm^{-1} et à 2900 cm^{-1} attribuées aux phases cristalline et amorphe respectivement. Pour nos polymères, l'indice de cristallinité de la chitine, chitosane synthétisé et chitosane commercial sont de 1.1439, 1.3455 et 0.944 respectivement. Dans la figure 31, les spectres de la chitine et du chitosane présentent les différences suivantes :

- 1- Accroissements très importants des intensités des bandes d'élongation de N-H à $3265\text{-}3200 \text{ cm}^{-1}$, observées en particulier sur le spectre IR du chitosane synthétisé et correspondant aux groupements amino formés.
- 2- Déplacement de la bande amide I dans la chitine à 1661 cm^{-1} vers les fréquences inférieures à 1658 cm^{-1} dans le chitosane, en raison des liaisons hydrogènes plus importantes.

3- Une intensification de la bande associée à la déformation de la liaison NH à 1623cm^{-1} par rapport à la bande amide I à 1658cm^{-1} dans le chitosane, par comparaison avec les bandes IR dans le spectre IR de la chitine, due à l'augmentation du nombre de NH_2 formé sur la chaîne du chitosane.

4- Intensification de la bande associée à la phase cristalline à 1378cm^{-1} dans le chitosane par rapport à la chitine, chose confirmée par le calcul de l'indice de cristallinité de ces deux polymères.

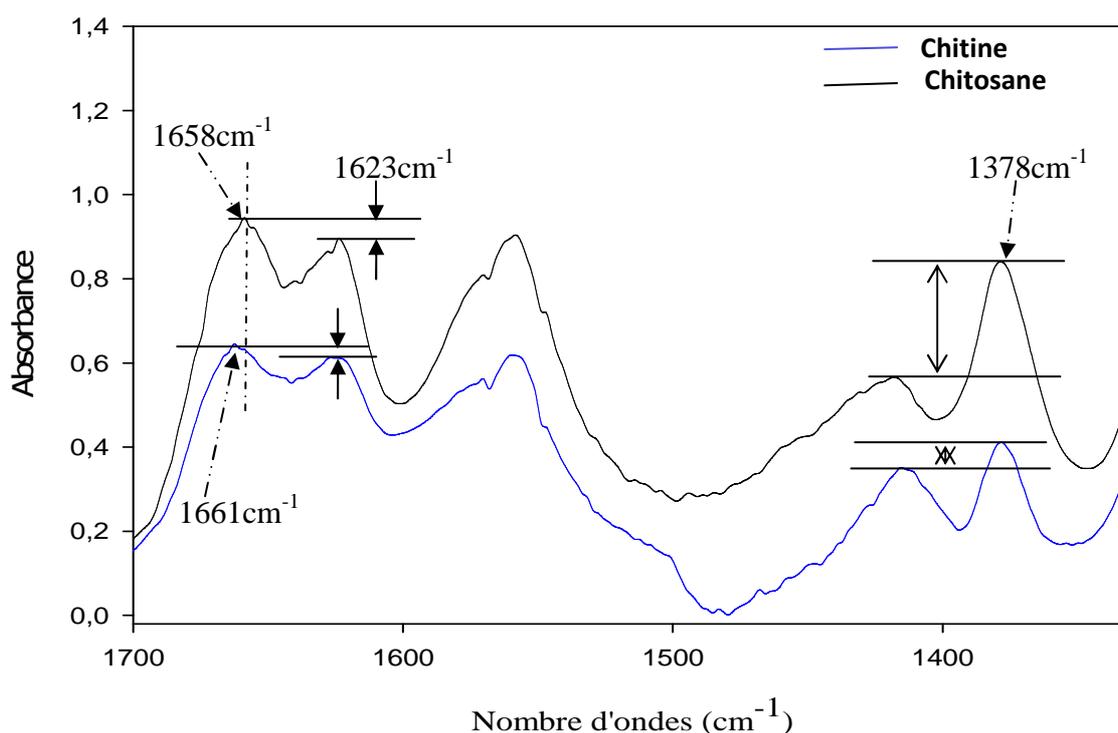
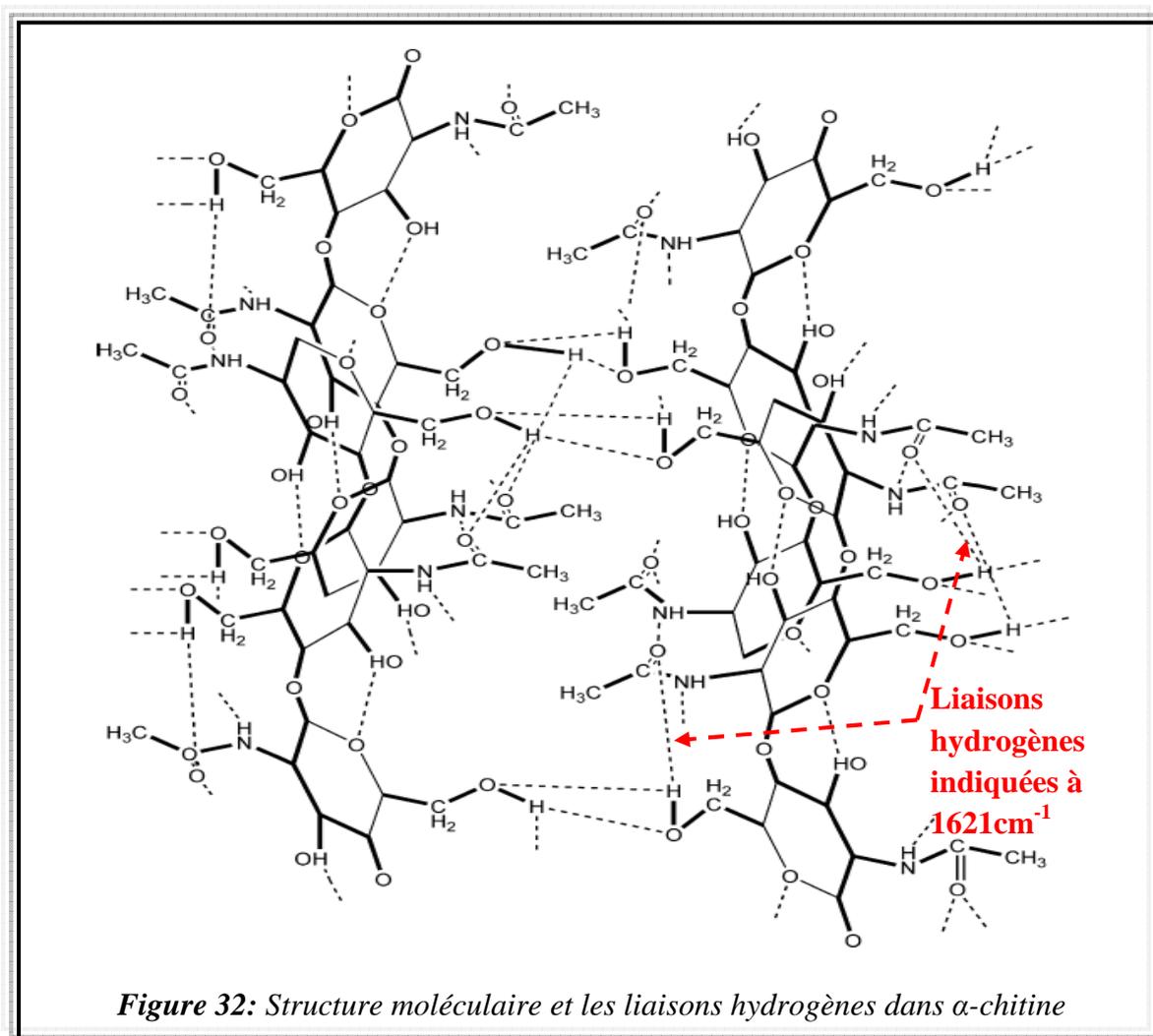


Figure 31 : Spectres FTIR illustrant les différences entre le chitosane synthétisé et la chitine

D'après les études réalisées par **Rinaudo M [38]**, dans α -chitine on retrouve deux bandes à 1623cm^{-1} et à 1656cm^{-1} attribuées à la bande « amide I » de la fonction amide secondaire, tandis que dans β -chitine il y apparition d'une seule bande d'absorption à 1626cm^{-1} (figure 34). Et dans notre cas, on note l'apparition des deux bandes à 1623cm^{-1} et à 1661cm^{-1} dans la chitine, alors qu'elle est à 1658cm^{-1} dans les deux chitosanes, synthétisé et commercial (figure 33). Ce qui nous permet d'attribuer à la chitine, qui a servi pour synthétiser le chitosane commercial le type de conformation 'alpha'.

Rinaudo M rapporte aussi que la bande à 1656 cm^{-1} (dans notre cas 1661 cm^{-1}) due à la liaison hydrogène intramoléculaire, entre le groupement NH et C=O, celle-ci est retrouvée beaucoup plus dans les protéines (qui sont des polysaccharides) et les polyamides, contrairement à la bande IR à 1621 cm^{-1} , qui n'est pas présente dans ces derniers. Il a conclu que son apparition indique, soit la présence d'une liaison hydrogène spécifique, entre le groupement C=O et le groupement hydroxyméthyl de la molécule adjacente, sur la même chaîne de la chitine, ou la forme énole de l'amide, comme le montre **Pillai C.K.S et ses collaborateurs [87]** dans la figure 32 :



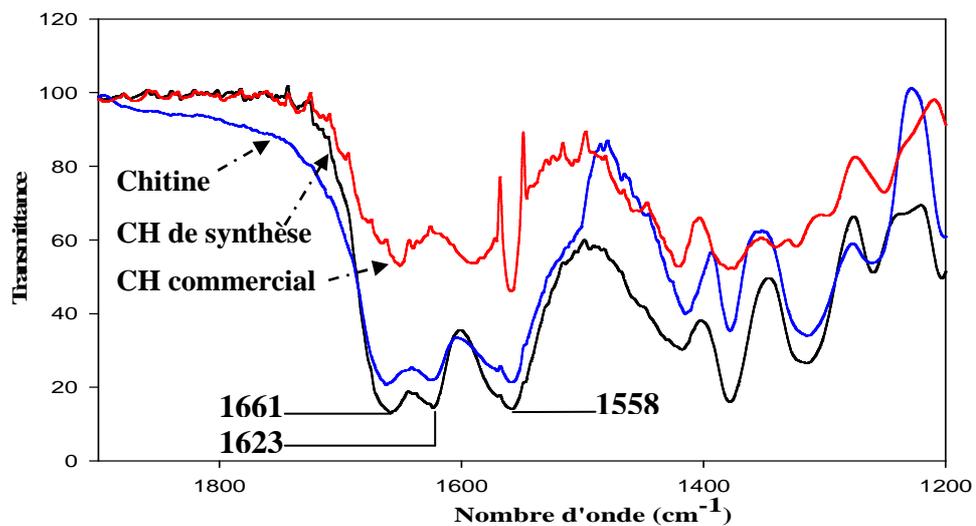


Figure 33: Spectre IR de la chitine et du chitosane synthétique et commercial entre 1900-1200cm⁻¹

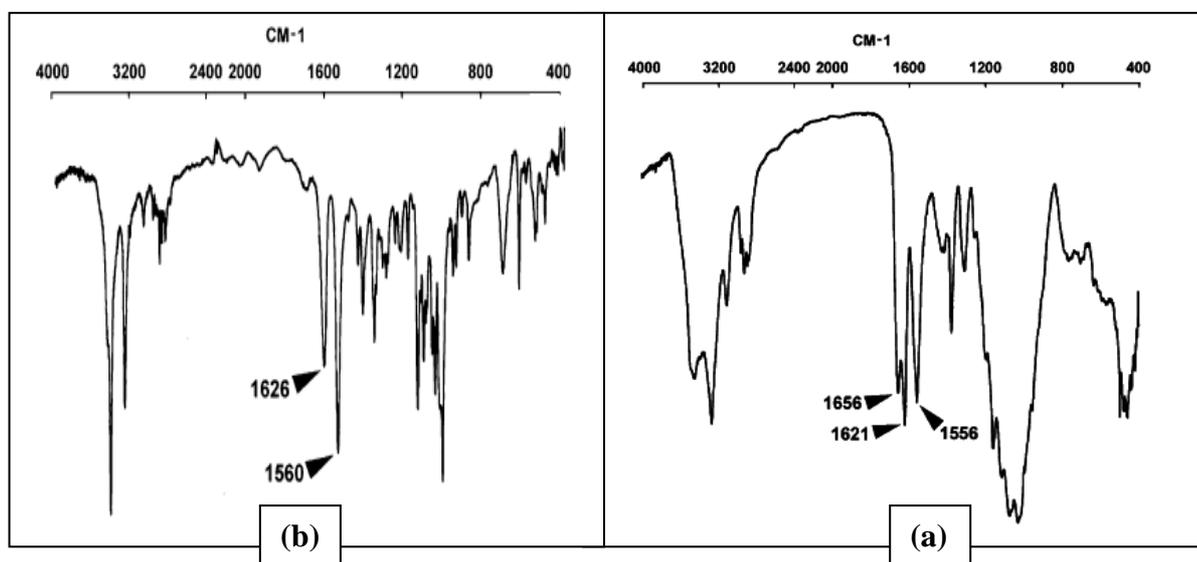
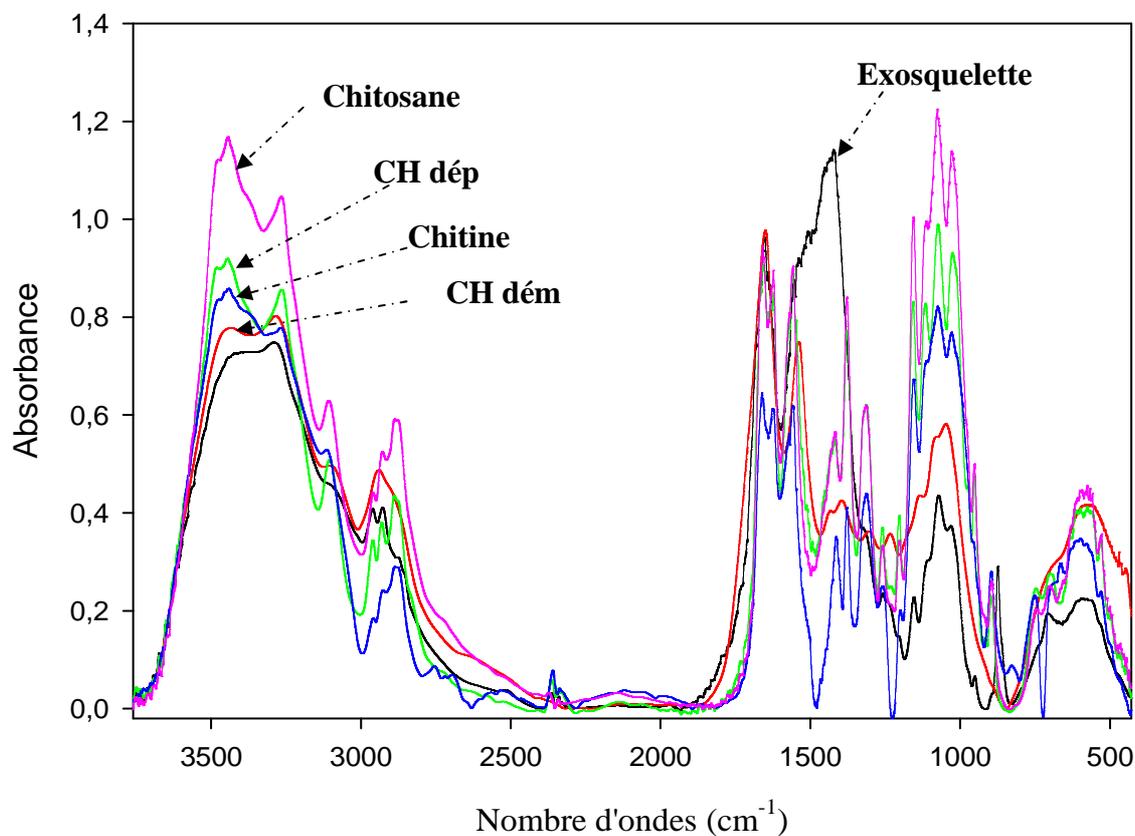


Figure 34: Spectre IR de la chitine : (a) type α , (b) type β [38]



CH dém : Exosquelette après étape de déminéralisation

CH dép : Exosquelette après étape de déprotéinisation

Figure 35 : Spectres des différents échantillons issus de la synthèse du chitosane

Dans la figure 35 on a superposé les spectres IR des différents échantillons issus de chaque étape de purification : exosquelette, déminéralisée, déprotéinée, chitine blanchée et le chitosane On observe :

- A la fréquence correspondant à la vibration de valence du groupement -OH , νOH à 3446cm^{-1} apparaît une bande sous forme d'un épaulement puis elle apparaît de plus en plus une bande large de forte intensité et dans les autres échantillons plus on purifie le produit plus elle est intense.
- A 3265cm^{-1} on observe une bande qui devient de plus en plus intense, elle est associée aux vibrations de valence symétriques et antisymétriques du -NH .

- A 2928 et 2960cm^{-1} on enregistre deux bandes dans l'exosquelette de faibles intensités qui sont associées aux vibrations d'allongement symétrique de CH-OH puis elle apparaît comme un épaulement dans l'échantillon déminéralisée à 2940 cm^{-1} et sous forme d'une bande moins intense dans l'échantillon déprotéiné avec apparition sur le spectre de ce dernier échantillon d'une nouvelle bande large à 2288cm^{-1} plus intense que les deux dernières, elle est associée à la vibration de valence symétrique de la liaison C-H₂ et qui devient plus intense après l'étape de désacétylation .
- On retrouve sur tous les spectres la bande associée à l'élongation de la liaison C=O (amide I) avec une intensité plus au moins identique dans l'intervalle de fréquence [1640 - 1668] cm^{-1} .
- On retrouve une bande à 1623cm^{-1} qui correspond à la bande de déformation dans le plan de la liaison N-H (amide secondaire) qui apparaît plus clairement dans l'échantillon déprotéiné, la chitine et le chitosane.
- A 1558 cm^{-1} elle apparaît une bande associée à $\delta\text{N-H}$ de NH₂ correspondant à la déformation dans le plan de N-H du groupe amine.
- Dans l'échantillon déminéralisé il y a apparition d'une nouvelle bande à 1417cm^{-1} qui correspond à δOH et δCH dans le cycle et à 1378 cm^{-1} il y a une bande associée à δCH_3 de la phase cristalline, elle est plus importante dans le chitosane que d'autres échantillons. Et la bande à 1314 cm^{-1} est attribuée à δCH_2 du groupement CH₂OH.
- On retrouve les bandes à 1260 cm^{-1} et 1204 cm^{-1} associées aux élongations C-O du cycle ou de H₂C-OH.
- A 1155 cm^{-1} on enregistre une bande associée à la vibration d'élongation de C-O-C de l'éther cyclique.
- Dans l'intervalle de fréquence [1125 - 600] cm^{-1} on enregistre plusieurs bandes qui sont associées aux vibrations de différentes liaisons dans le cycle ; déformation de OH dans le groupement CH₂-OH primaire ou élongation de C-O d'éthers.

Ces résultats concordent avec ceux trouvés avec la microanalyse par l'EDAX qui montre qu'après l'étape de désacétylation le pourcentage massique de carbone (C%) et de l'azote (N%) ainsi que le rapport N/C augmentent tandis que le pourcentage de l'oxygène diminue tableau 17.

Tableau 17: Analyse élémentaire de la chitine et du chitosane

Echantillons	Les éléments %			N/C
	N	C	O	
<i>Chitine</i>	6.69	53.87	27.15	0.12
<i>Chitosane synthétique</i>	11.17	64.25	24.10	0.17
<i>Chitosane commercial</i>	12.03	64.38	22.42	0.18

I.6 Analyse thermogravimétrique

Les thermogrammes, présentés sur les figures 36,37 et 38 montrent la variation de la masse du polymère au cours de sa dégradation en fonction de la température (courbe TG), ainsi que la variation de la vitesse à laquelle cette dégradation a eu lieu (courbe DTG) pour la chitine, le chitosane synthétique et le chitosane commercial respectivement.

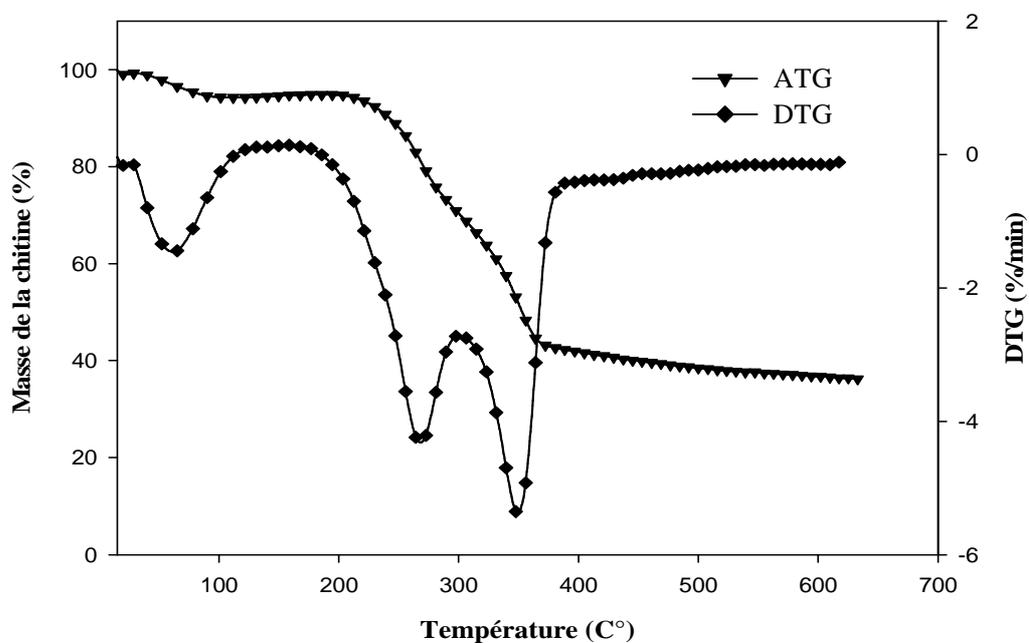


Figure 36: Thermogrammes ATG/DTG de la chitine

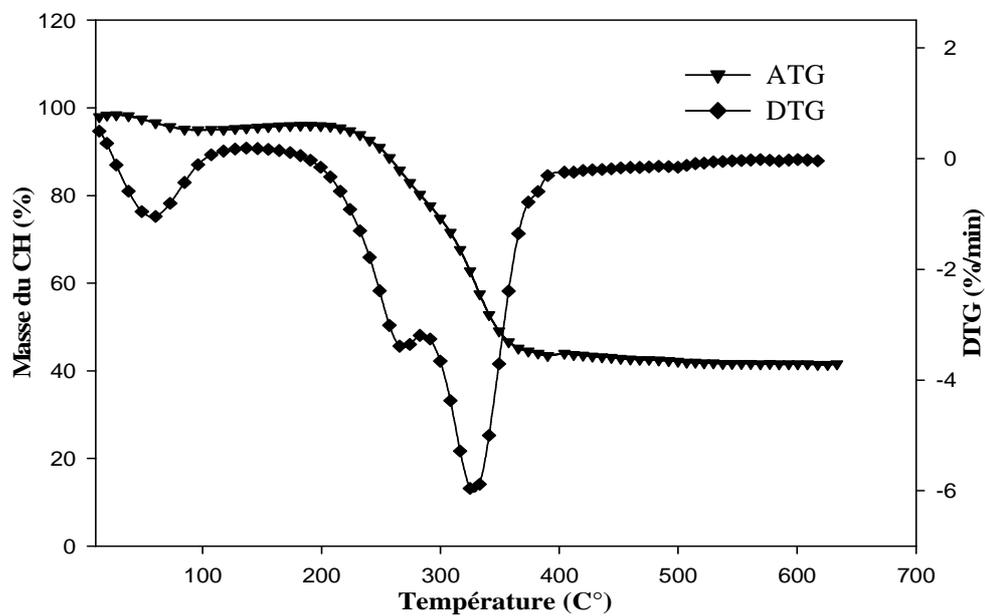


Figure 37: Thermogrammes ATG/DTG, du chitosane synthétique

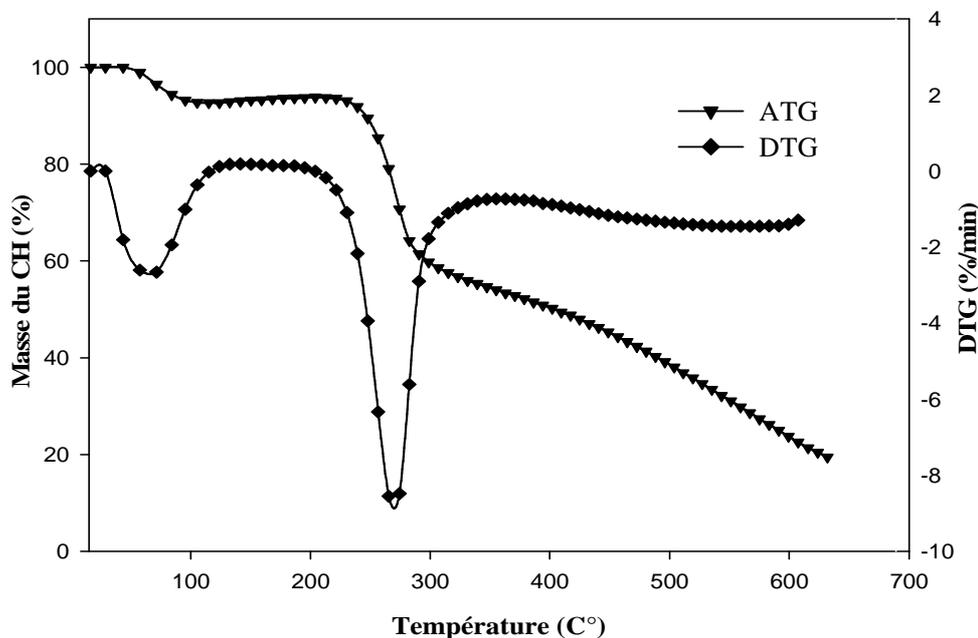


Figure 38: Thermogrammes ATG/DTG du CH commercial

Les températures de dégradation et du début de dégradation, sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 18: Températures de décomposition de la chitine, chitosane (synthétique et commercial)

<i>Echantillon</i>	T_d (C°)	T_{max} (C°)	T_f (C°)	Résidu à T_f (%)
<i>Chitine</i>	40.1	T1= 65.2 T2= 264.3 T3= 347.7	380.6	42.652
<i>CH synthétisé</i>	19.4	T1= 60.6 T2= 265.7 T3= 324.9	373.9	44.454
<i>CH commercial</i>	57.7	T1= 71.5 T2= 271.544	331.2	55.938

Où :

T_d : Température de début de dégradation prise à 2% de la masse dégradée ;

T_{max} : Température de dégradation qui correspond à un maximum de la vitesse de dégradation ;

T_f : Température finale de décomposition à laquelle on ne note pas de variation de masse ;

Résidu à T_f : résidu enregistré à T_f .

Les trois thermogrammes des échantillons : chitine et chitosanes (de synthèse et commercial) montrent une perte de masse initiale à $T < 100^\circ\text{C}$, ce qui est attribué au départ des molécules d'eau ou de solvant restés attachés dans leurs structures et qui ont servi pour leurs synthèse.

Les deux chitosanes synthétique et commercial se dégradent entre 200 et 300°C avec une vitesse de dégradation maximale à 265.7 et 271.544°C respectivement (figures 37 et 38). Ce résultat est en accord avec celui trouvé par **Nugraha Edhi Suyatma [88]** qui rapporte une température de dégradation de 253°C .

Le résultat de cette analyse montre que le chitosane synthétisé présente une température de début de dégradation et une température de dégradation plus faible que celle du chitosane commercial ce qui est dû probablement à la différence de leurs masses viscosimétriques, le premier présentant un poids moléculaire inférieur à celui du second polymère.

Cette analyse montre que la température de dégradation de la chitine est de 264.3°C qui est faible devant celle du chitosane qui est de 265.7°C , ce qui est dû probablement à l'effet qu'il peut

avoir lieu la différence de leurs cristallinité. Cette conclusion confirme nos résultats de l'analyse infra rouge.

Cependant le pic à $347.7C^{\circ}$ dans la chitine est attribué à l'existence des impuretés et il est décalé à une température plus basse à $324.9C^{\circ}$ dans le chitosane synthétisé et nous pensons que cette diminution de la température de dégradation est le résultat d'une forme plus libre de ces impuretés provoquée par la réaction de désacétylation.

I.7 Analyse par diffraction des rayons X

L'analyse des diffractogrammes des rayons X des matériaux chitine, chitosane synthétisé et chitosane commercial présentés sur les figures ci-dessous révèlent l'existence de phases cristallines par la présence des pics caractéristiques.

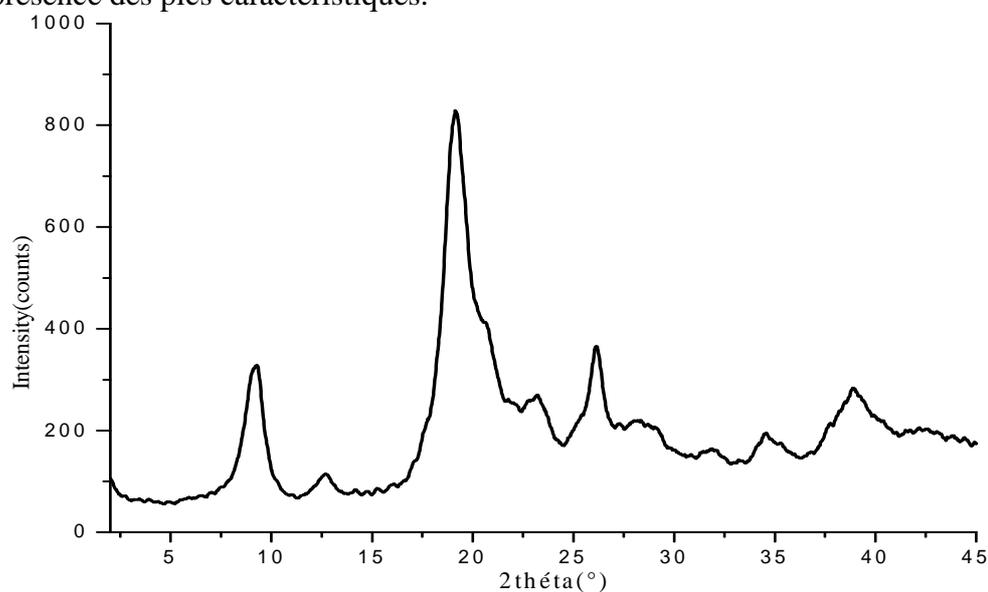


Figure 39: Courbe DRX de la chitine

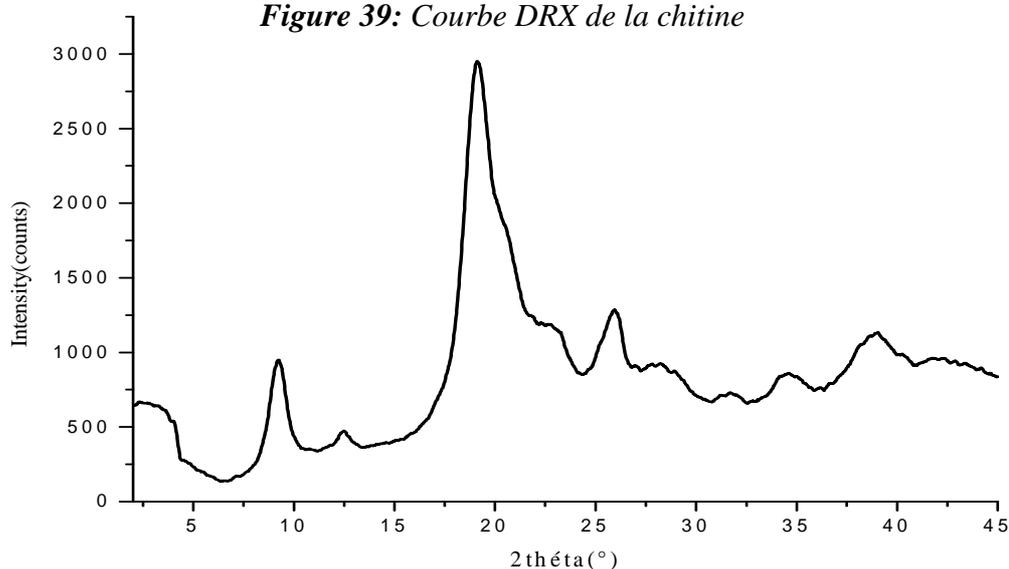


Figure 40: Courbe DRX du chitosane synthétisé

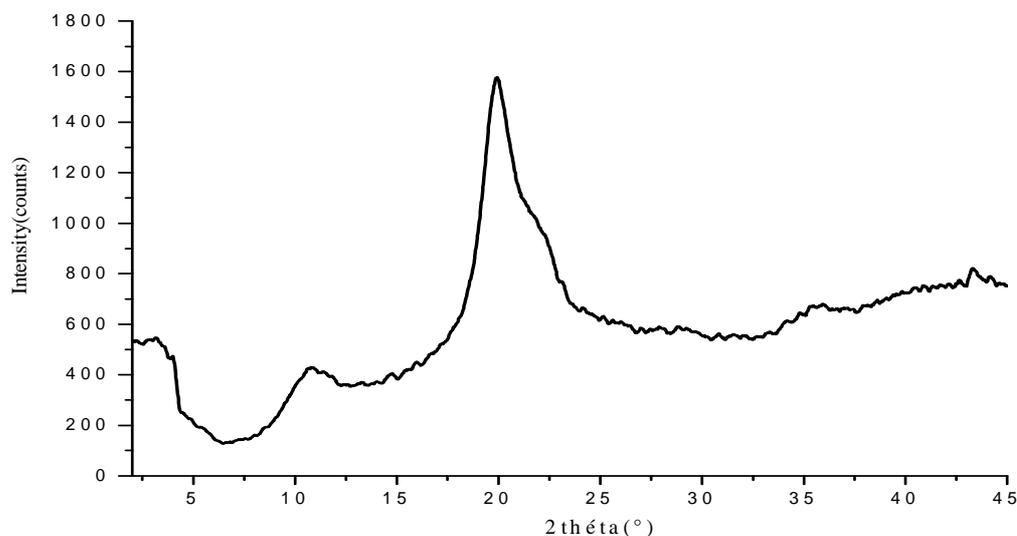


Figure 41: Courbe DRX du chitosane commercial

La chitine et le chitosane présentent une structure cristalline orthorhombique.

Nous observons sur les diffractogrammes de la chitine et du chitosane synthétisé apparition de pics de cristallinité aux mêmes positions (à $2\theta = 9.2^\circ$, 19.09° et 26°) et (à $2\theta = 9.2^\circ$, 19.09° et 25.93°) respectivement, avec des intensités relativement plus importantes pour le chitosane synthétisé, ce qui caractérise un polymère plus ou moins cristallisé (semi-cristallin).

De son côté le chitosane commercial présente un pic à $2\theta = 19.97^\circ$ et le pic détecté dans les deux autres échantillons à 26° n'apparaît pas, tandis que le pic à $2\theta = 9^\circ$ apparaît ici sous forme d'une large bande. Nous pensons que cela est une conséquence du traitement industriel qu'il a subi et qui a engendré une diminution de sa cristallinité et tend vers un matériau plus amorphe.

Ceci a pour conséquence d'augmenter, d'un point de vue physico-chimique, sa solubilité par rapport à celle du chitosane synthétisé.

I.8 Caractérisations par la Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est une technique qui nous permet de visualiser la morphologie d'un matériau, dont la taille de ses particules dépend de la nature, de l'orientation et de la disposition spatiale des éléments dans le composé macromoléculaire. La chitine et le chitosane sont de longues chaînes de polysaccharide, constitués d'unités de répétition D-glucosamine et N-

acétyl-D-glucosamine, liées par des liaisons β -(1-4) formant ainsi une fibre naturelle. Les images MEB ainsi représentées illustrent clairement cette structure fibreuse, caractérisée par un diamètre moyen des fibres, de l'ordre de $7\mu\text{m}$ pour le chitosane synthétisé et de $5,8\mu\text{m}$ pour le chitosane commercial. Celle du chitosane est plus ou moins uniforme et ordonnée que celle de la chitine.

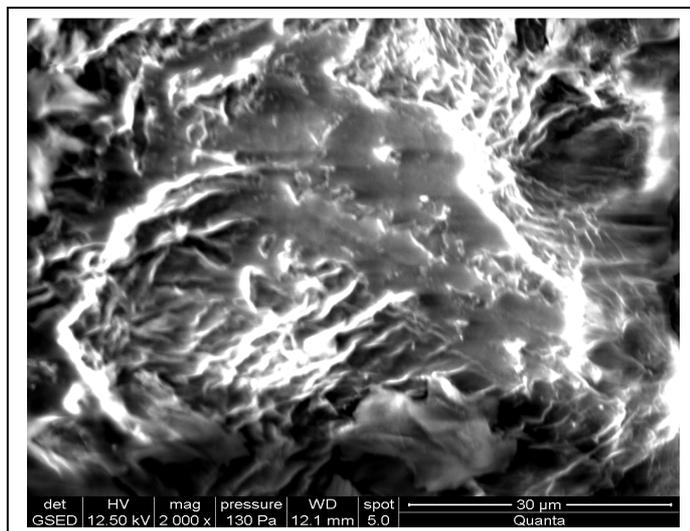


Figure 42: Image MEB de la chitine

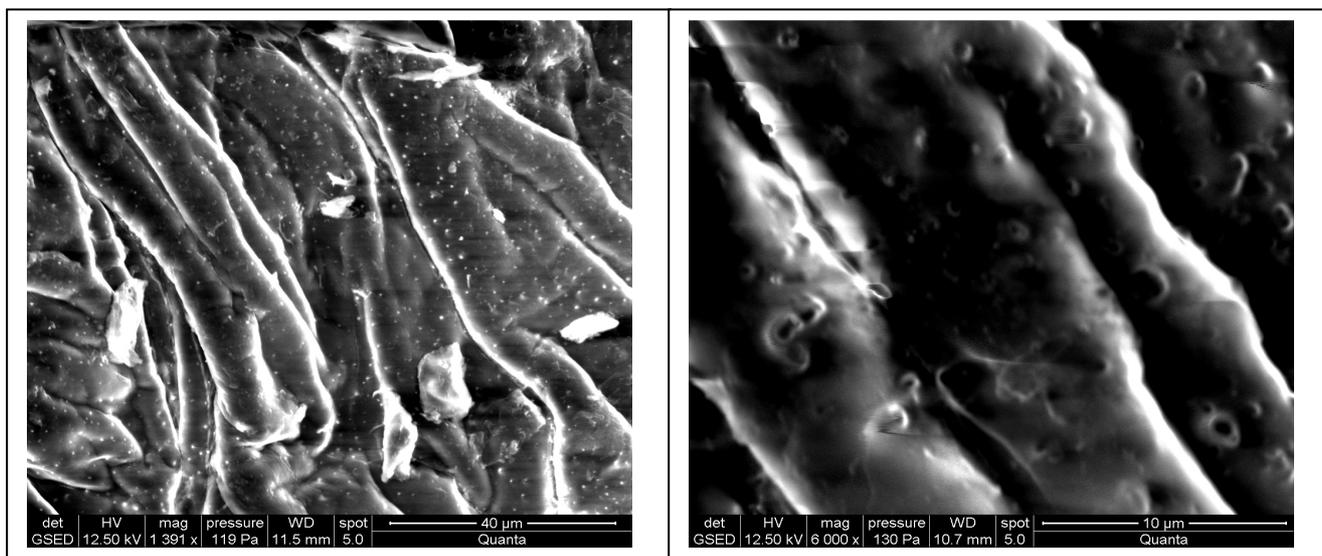


Figure 43: Images MEB du chitosane synthétisé

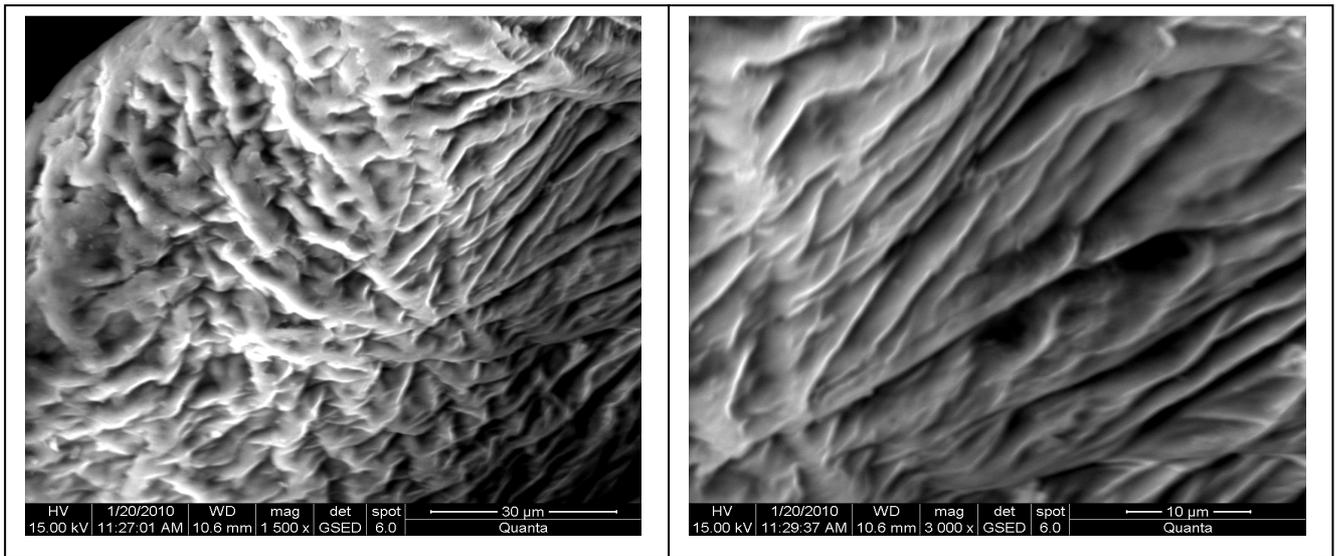


Figure 44: Image MEB du chitosane commercial

La comparaison des images MEB du chitosane synthétique et commercial, montre qu'il existe une très grande similitude entre les deux formes fibreuses des deux polymères.

II. Caractérisation de la tobramycine et étude antibactérienne

II.1 Caractérisations par spectrométrie infrarouge (FTIR)

Le spectre IR de la tobramycine, présenté dans la figure 45, montre l'existence de plusieurs bandes d'absorption dans l'intervalle de fréquences variant de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} , attribuées aux différentes liaisons de la molécule. L'ensemble des bandes d'absorption ainsi que leurs modes de vibration sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 19 : Principales bandes d'absorption de la tobramycine et leurs groupements attribués

Fréquence (cm^{-1}) données par la littérature	Fréquence (cm^{-1}) enregistrée	Attribution aux liaisons
3500-3100	3443.65	2 doublets de $\nu\text{NH}_{2,s}$ et ν_{as}
	3350.94	d'amine primaire liés par
	3291.34	des liaisons hydrogènes
	3178.76	inter et intramoléculaires, superposées à $\nu(\text{OH})_{lié}$, d'alcool large.
3000-2800	2927.11	$\nu\text{CH}_{2,s}$ et ν_{as}
	2907.25	
1650-1580	1599.46	$\delta_{dp}\text{NH}_2$ (cisaillement)
1550-1430	1465	$\nu(\text{N-C})$ d'amine primaire
1500-1000	1350	δOH tertiaire superposée avec les bandes de déformation de CH_2
1200- 1000	1068-1010	Chevauchement de plusieurs bandes $\nu\text{C-O}$ d'éther cyclique et non cyclique avec celle d'alcool (fortes)
800-600	800-600	Plusieurs bandes faibles de $\delta_{hp}\text{NH}_2$

ν : vibration de valence, δ : vibration de déformation, s : symétrique, as : asymétrique.

dp : dans le plan, hp : hors plan

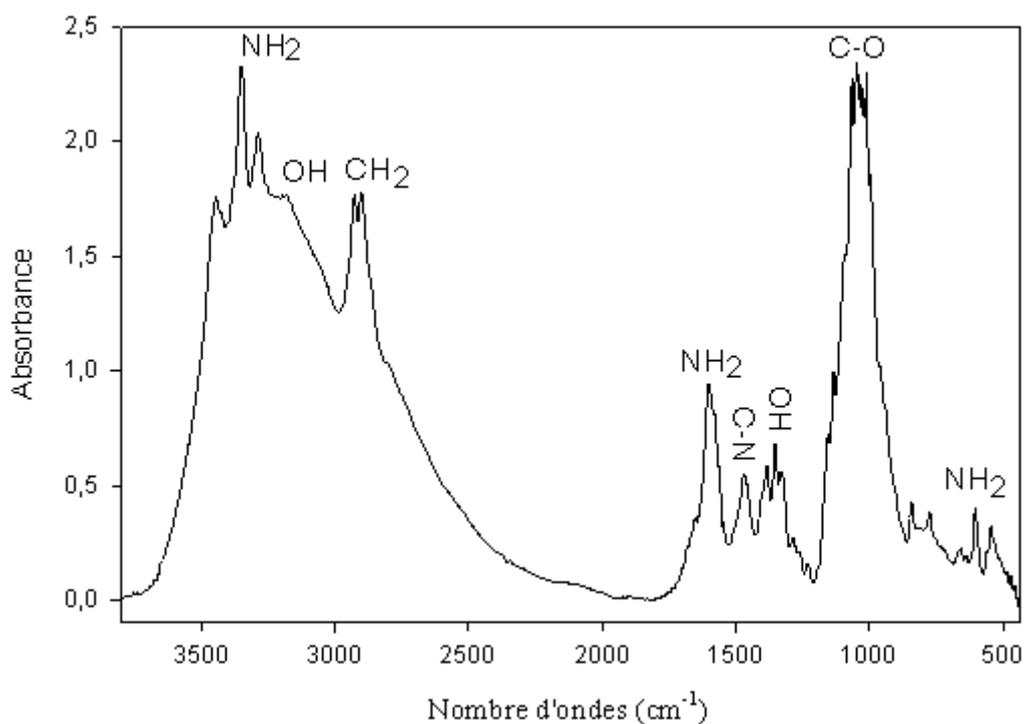


Figure 45: Spectre FTIR de la tobramycine

II.2 Analyse thermogravimétrique

La figure 46 présente les thermogrammes de la perte de masse ATG(%) et de la cinétique de dégradation DTG (%/min) de la tobramycine, en fonction de la température par balayage entre la température ambiante et 600°C, avec un pas de 10°C/min. D'après la cette figure, on constate que la température de début de décomposition thermique est au voisinage de 86.8°C. La courbe DTG traduit la vitesse à laquelle se décompose la tobramycine, d'après celle-ci on remarque deux pics correspondants à l'apparition de deux plateaux de dégradation, le premier est dû à l'évaporation des molécules du solvant à 74.6°C et le second correspond à la décomposition de la tobramycine à 273.6°C. Les résultats sont regroupés dans le tableau qui suit :

Tableau 20: Températures de décomposition de la tobramycine

Echantillon	T_d (C°)	T_{max} (C°)	T_f (C°)	Résidu à T_f (%)
Tobramycine	86.8	T1= 74.6 T2= 273.6	460.2	44.735

Où :

T_d : Température de début de dégradation prise à 2% de la masse dégradée ;

T_{max} : Température de dégradation qui correspond à un maximum de la vitesse de dégradation ;

T_f : Température finale de décomposition à laquelle on ne note pas de variation de masse ;

Résidu à T_f : résidu enregistré à T_f .

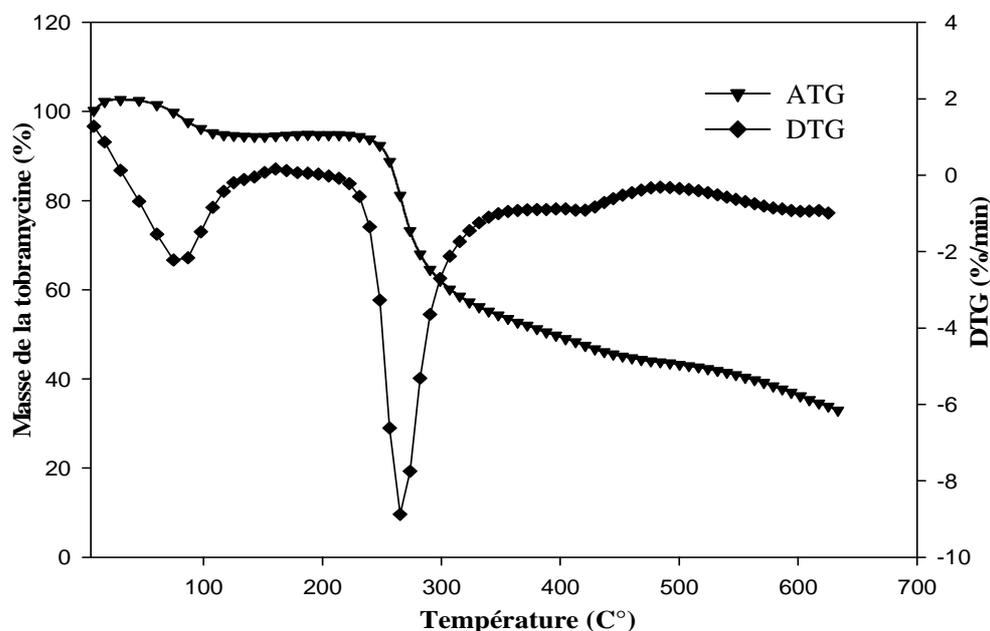


Figure 46: Thermogrammes de la perte de masse (ATG) et la vitesse de dégradation (DTG) de la tobramycine

II.3 Analyse par diffraction des rayons X

Le spectre DRX de la tobramycine représenté sur la figure 47 présente une structure cristallographique non connue dont les pics les plus intenses sont observés pour des valeurs de $2\theta = 8.11^\circ, 11.26^\circ, 17.35^\circ, 17.89^\circ, 19.42^\circ, 20.94^\circ$ et 22.03° .

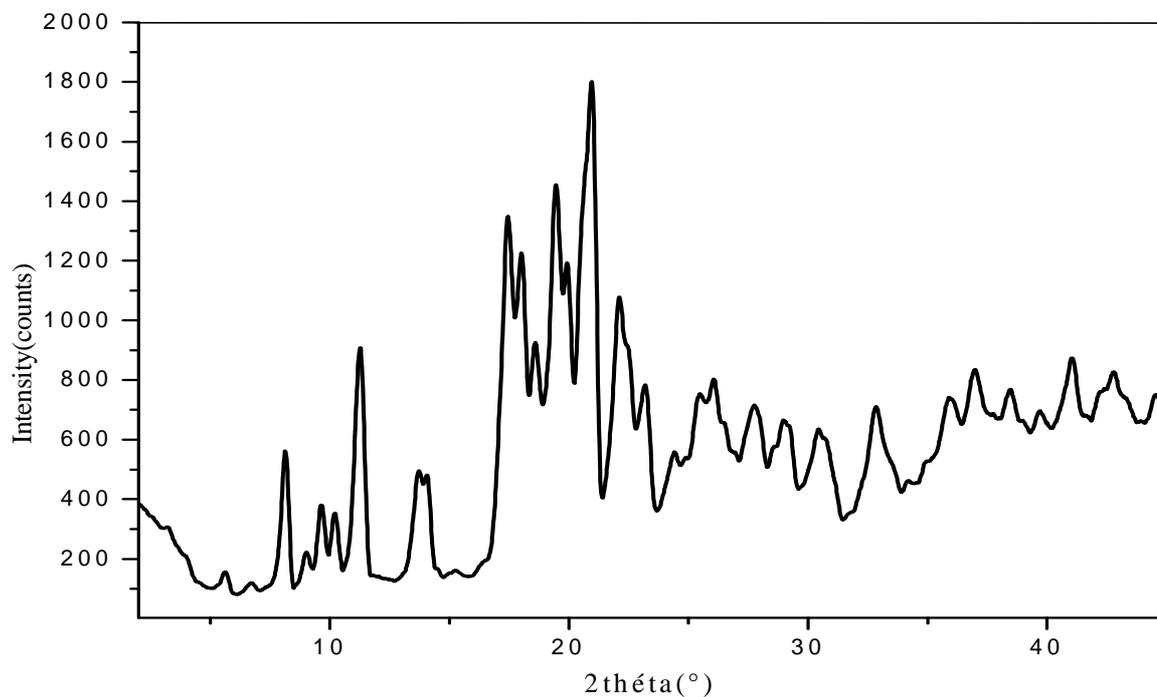


Figure 47: DRX de la tobramycine

II.4 Caractérisations par la Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

L'examen d'une poudre de tobramycine cristallisée réalisée sur deux sites distincts de l'échantillon, a donné les deux images par MEB figure 48 avec différents grossissements et à différents endroits, qui montrent une structure plus ou moins fibreuse.

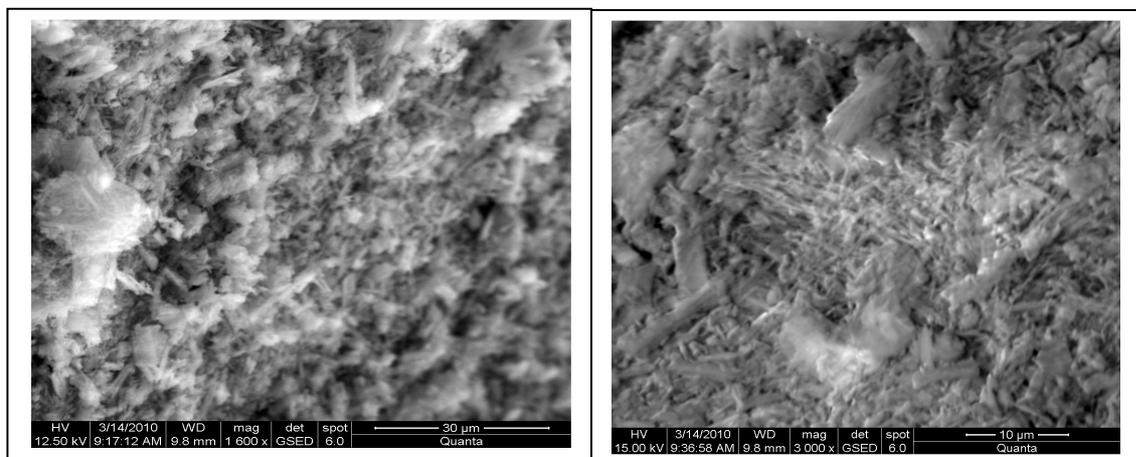


Figure 48: Image MEB de la tobramycine

II.5 Etude de l'activité antibactérienne du chitosane

Afin d'étudier l'activité antibactérienne du chitosane (CH) et du chitosane associé à la tobramycine, présentant des poids moléculaires et des degrés de désacétylation différents, vis-à-vis du germe de *Staphylocoque aureus* (S220), des tests sur gélose ont fait l'objet de cette étude au moyen de la technique des puits à différentes concentration du polymère et pH. Les résultats obtenus sont présentés et commentés dans cette partie.

Le diamètre critique de la zone d'inhibition sur laquelle repose notre étude, est donné par les tables établies par le Comité d'Antibiogrammes de la Société Française de Microbiologie (CASFM), qui est de **18mm** et définit la sensibilité des *Staphylocoques aureus* (germes) vis-à-vis de la tobramycine (antibiotique) [89].

- Le diamètre obtenu après incubation pour le test témoin est 30mm,
- Pour notre tobramycine en solution à 0,3% déposée avec un volume de 20 μ l, on a obtenu un diamètre de la zone d'inhibition de 31mm, pour la même durée d'incubation. Ce qui confirme la sensibilité des germes *Staphylocoques aureus* à notre principe actif.
- Pour les tests réalisés avec les deux polymères seuls, on a remarqué la formation de petites zones d'inhibitions autour des puits. D'après **Wang [90] et Chang et al, [91]** le chitosane à 0.5, 1 et 1.5%, peut inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus* dans ces mêmes conditions. Ce qui nous laisse supposer que la viscosité du polymère été un facteur qui ne favorise pas sa diffusion dans la gélose, pour agir suffisamment contre les germes de la souche précédente.

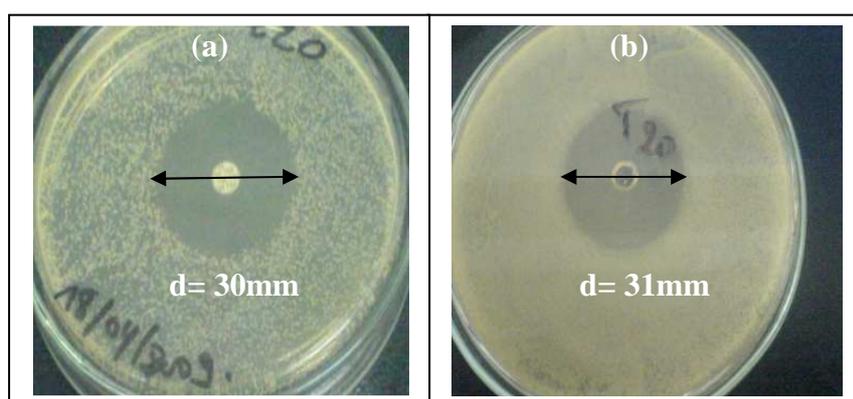
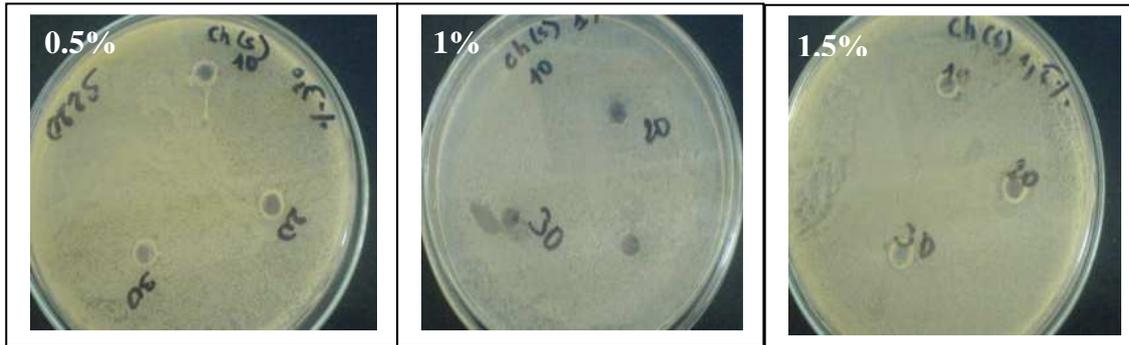


Figure 49 : Zones d'inhibitions (a) disque de tobramycine, (b) tobramycine en solution à 0,3%

pH=5.8



pH=6.2

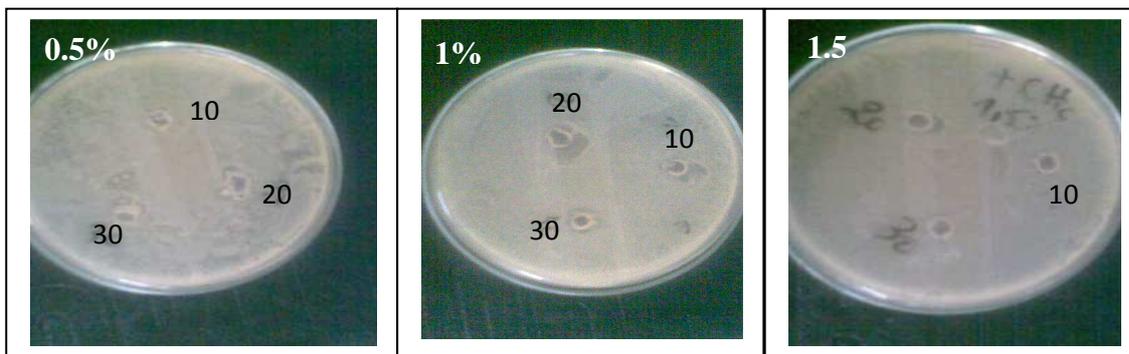
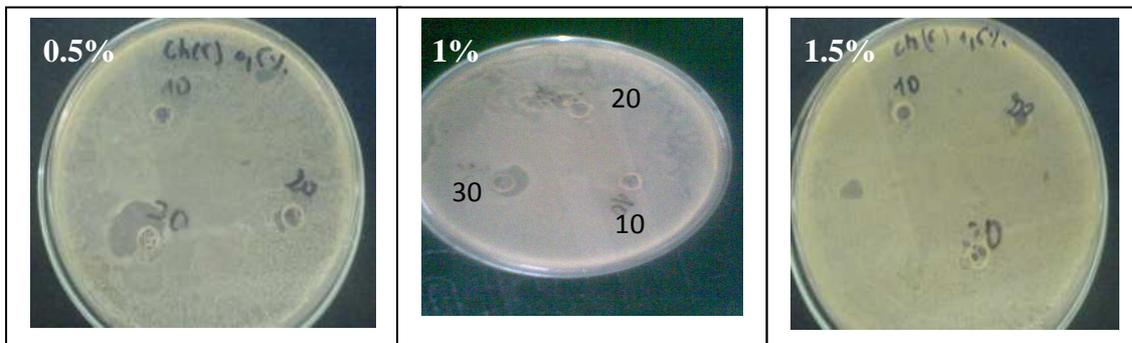


Figure 50: Test d'activité pour le chitosane synthétisé

pH=5.8



pH=6.2

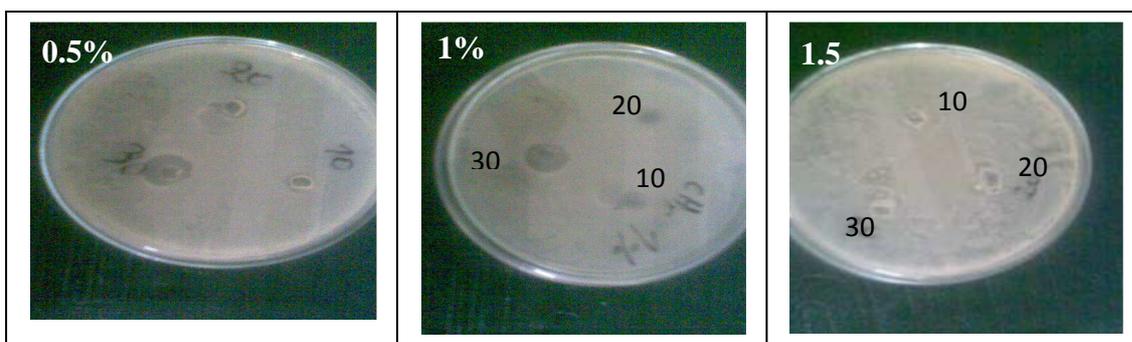


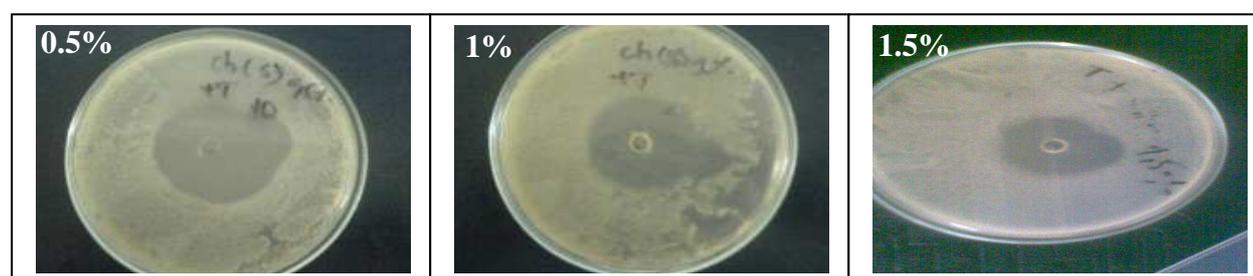
Figure 51: Test d'activité pour le chitosane commercial

Tableau 21: Diamètres de zone d'inhibition pour le complexe chitosane synthétisé-tobramycine

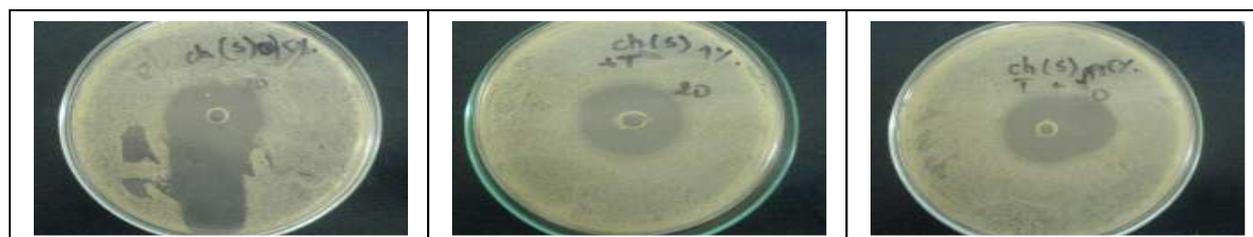
	Diamètre d'inhibition (mm)					
	Tobramycine +CH à 0.5%		Tobramycine +CH à 1%		Tobramycine+ CH à 1.5%	
pH	5.8	6.2	5.8	6.2	5.8	6.2
20 /10 μ l	32	28	30	27	33	25
20/20 μ l	34	28	28	27	27	28
20 /30 μ l	32	27	30	26	29	25

Tableau 22: Diamètres de zone d'inhibition pour le complexe chitosane commercial-tobramycine

	Diamètre d'inhibition (mm)					
	Tobramycine +CH à 0.5%		Tobramycine +CH à 1%		Tobramycine+ CH à 1.5%	
pH	5.8	6.2	5.8	6.2	5.8	6.2
20 /10 μ l	45	31	35	30	32	29
20/20 μ l	38	30	30	29	28	27
20 /30 μ l	32	30	28	27	27	26



V (Tobramycine/ CH)= (20/10) μ l



V (Tobramycine/ CH)= (20/20) μ l

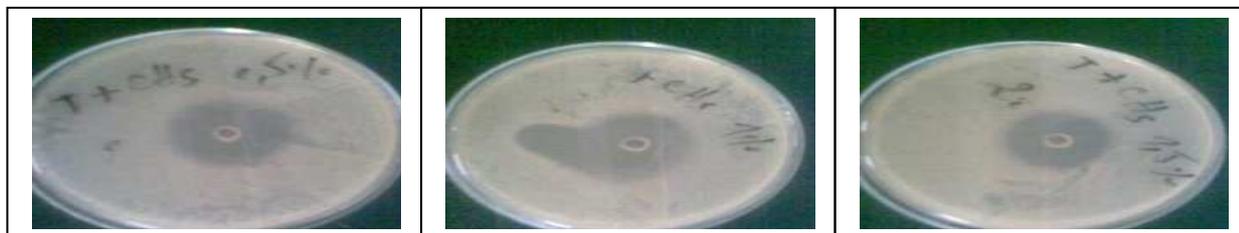


V (Tobramycine/ CH)= (20/30) μ l

Figure 52: Zones d'inhibition pour le CH synthétisé-tobramycine à différents volumes d'injection à pH=5,8



$V(\text{Tobramycine}/\text{CH}) = (20/10) \mu\text{l}$



$V(\text{Tobramycine}/\text{CH}) = (20/20) \mu\text{l}$



$V(\text{Tobramycine}/\text{CH}) = (20/30) \mu\text{l}$

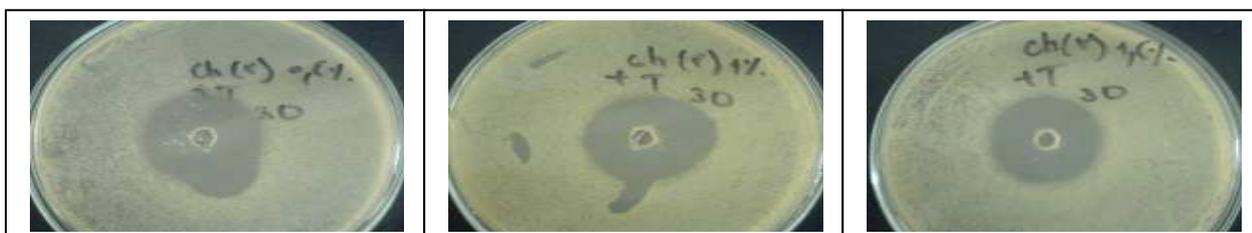
Figure 53 : Zones d'inhibition pour le CH synthétisé-tobramycine à différents volumes d'injection à pH=6,2



$V(\text{Tobramycine}/\text{CH}) = (20/10) \mu\text{l}$



$V(\text{Tobramycine}/\text{CH}) = (20/20) \mu\text{l}$



$V(\text{Tobramycine}/\text{CH}) = (20/30) \mu\text{l}$

Figure 54 : Zones d'inhibition pour le CH commercial-tobramycine à différents volume d'injection à pH=5,8

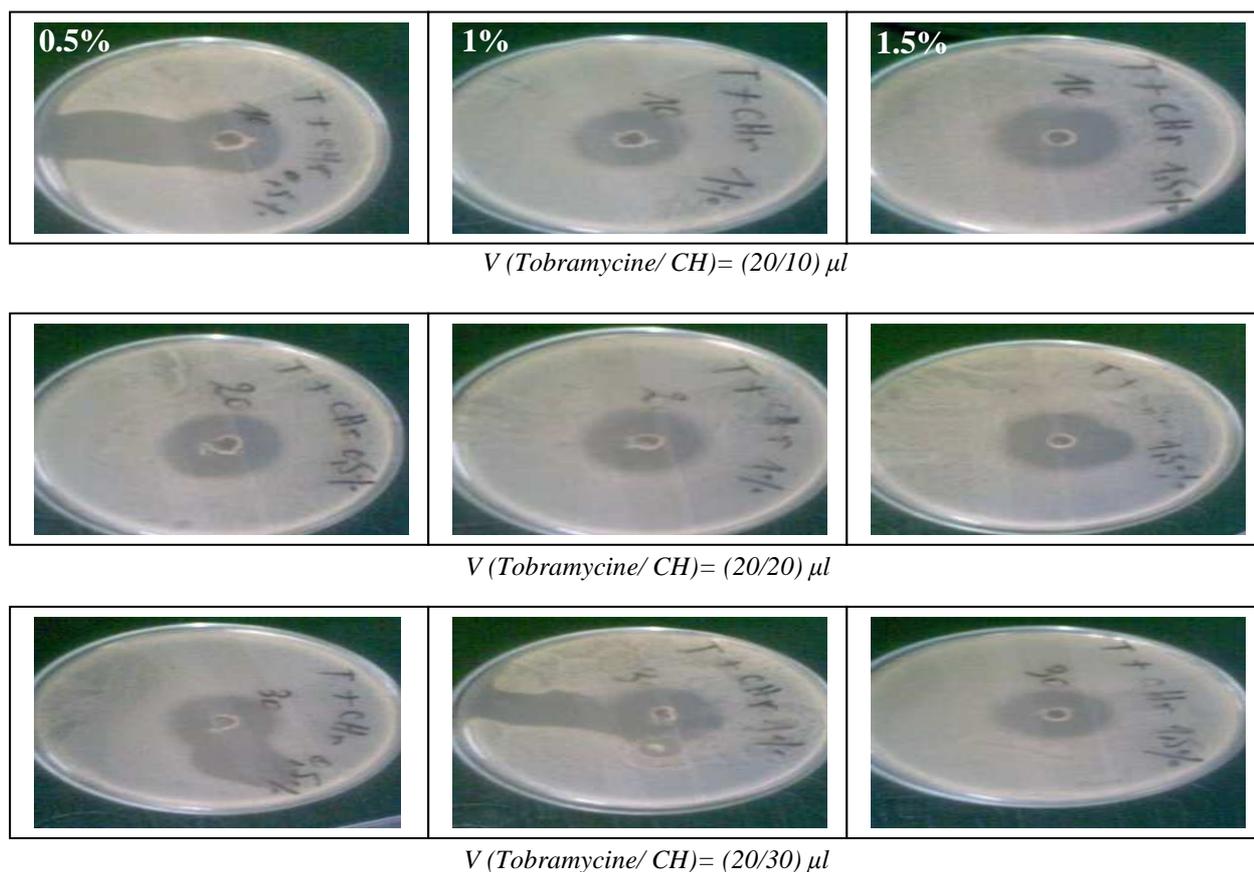


Figure 55: Zones d'inhibition pour le CH commercial-tobramycine à différents volume d'injection à pH=6,2

Les résultats obtenus pour les zones d'inhibition révèlent que le chitosane, à différents poids moléculaires, concentrations et degré de désacétylation associé à la tobramycine améliore nettement l'activité antibactérienne à pH= 5,8. Ceci est dû aux propriétés physico-chimiques du polymère, comme il a été montré dans le test précédent de solubilité. Plus le pH diminue plus la solubilité augmente, grâce à la protonation des groupements NH_2 du chitosane, et plus les chaînes du polymère seront mieux solvatées et peuvent ainsi mouvoir plus aisément dans le milieu, pour atteindre la cible (germes). La formation d'ammoniums peut avoir également deux conséquences très importantes : la première est de développer un pouvoir catalytique sur l'antibiotique, et la seconde de fixer les germes afin d'inhiber leur action (effet bactériostatique du polymère). Dans notre cas, plus la quantité augmente plus l'activité diminue, car la viscosité de l'échantillon polymère-principe actif est d'autant plus importante qu'il est difficile de diffuser dans le milieu.

L'effet du poids moléculaire et le degré de désacétylation sont observés, le chitosane synthétisé présente un DD supérieur à celui commercialisé et un faible poids moléculaire, mais l'activité antibactérienne croît avec l'augmentation du poids moléculaire. Ainsi, l'activité

antibactérienne est plus prononcée à faible concentration. Ces résultats sont appuyés par les travaux de **Mohy Eldin M.S et al [81]** et **Qin C et al [92]**. En règle générale, plus le poids moléculaire diminue, plus les chaînes du polymère ont plus de liberté de diffuser ainsi que l'activité antibactérienne augmente. Néanmoins, cette augmentation est limitée, **Kim S.K et Rajapakse N [93]** rapportent que l'activité antibactérienne dépend aussi du degré de polymérisation et de type de bactéries cibles. Ces deux derniers auteurs rajoutent aussi que la charge positive du groupement amino sur le carbone C2 de la chaîne, forme un complexe avec les charges négatives du groupement carboxyle, localisées à la surface de la cellule bactérienne, en formant ainsi une couche imperméable pour la bactérie. Par conséquent, elle subit une déstabilisation de son métabolisme, en bloquant le passage des éléments nutritionnels vers l'intérieur de la cellule. Une hypothèse qui peut être émise, en plus de l'effet du poids moléculaire et du degré de désacétylation, la pureté du produit est une caractéristique physicochimique très importante qui peut influencer énormément l'activité antibactérienne du polymère, et de là celle du principe actif en question. Donc, on peut aussi penser que notre polymère, malgré son poids moléculaire faible et son degré de désacétylation important, le fait qu'il est moins pur que le chitosane commercial, des quantités mêmes infimes de protéines, de β -carotène et de calcite, subsistant après la synthèse du chitosane, peuvent constituer des impuretés qui auront une action favorable à la prolifération des germes. Et par conséquent diminuer globalement l'effet bactériostatique du polymère. Par ailleurs, **Beaulieu C et al [94]** précisent que le poids moléculaire, le degré de désacétylation et la pureté du chitosane sont trois caractéristiques qui doivent être précisément contrôlées. Il rajoute aussi que la pureté du produit de chitosane est incontournable, surtout pour les applications de hautes gamme. Cette pureté est évaluée par les quantités de minéraux, de protéines ou de matières insolubles résiduelles qui peuvent rendre moins efficace en bloquant des sites réactifs, c'est-à-dire les groupements amines libres de la molécule.

III. Cinétique de libération de la tobramycine

III.1 Caractérisation texturale

La caractérisation de la texture des matériaux repose essentiellement sur les isothermes d'adsorption et de désorption de l'azote à sa température de liquéfaction (77°K). Rappelons que la texture d'un solide peut être définie par sa surface spécifique, son volume poreux, la forme et la taille de ces pores ainsi que la distribution poreuse.

L'allure des isothermes d'adsorption est un paramètre, parmi les indicateurs de formes et des caractéristiques texturales des matériaux solides.

Les isothermes d'adsorption-désorption d'azote sont tracées, pour les deux adsorbants du chitosane synthétisé (F3 à pH=5 et 6), en portant la quantité adsorbée par gramme d'adsorbant en fonction de la pression relative. Les résultats obtenus sont tracés sur la figure 56.

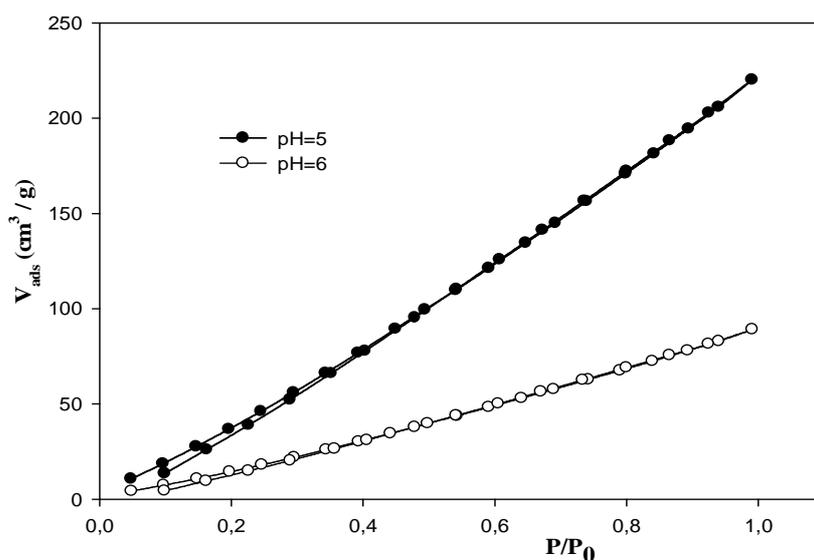


Figure 56: Isothermes d'adsorption et de désorption d'azote pour F3 à pH=5 et 6

Les isothermes d'adsorption de gaz azote, obtenues sur les deux matériaux s'apparentent au type III de la classification de l'IUPAC.

Les paramètres cités ci-dessus ont été déterminés en appliquant la loi de BET (Brunauer, Emmett et Teller) qui est valable dans le domaine de pression relative $0,05 \leq P/P_0 \leq 0,35$. Les résultats sont regroupés dans le tableau 23:

Tableau 23: Caractérisation des pores des formulations F3 du chitosane synthétisé

<i>Matériaux F3</i>	<i>Volume poreux total</i> V_p (cm ³ /g)	<i>Surface spécifique</i> S_{BET} (m ² /g)	<i>Rayon moyen des pores</i> r_p (Å)	<i>Porosité</i> ζ
<i>pH=5</i>	0.3405	298.079	1021	0.0432
<i>pH=6</i>	0.1377	116.395	1068.8	0.0179

On observe que l'échantillon F3 préparé à base du chitosane synthétisé à pH=5 présente une surface spécifique plus importante. Par conséquent le volume du gaz adsorbé est alors important. Ce résultat concorde avec ceux trouvés pour l'étude de la solubilité du polymère à différents pH ; le chitosane préparé à pH=5 est plus soluble que celui préparé à pH=6, due à la bonne dispersion des chaînes du premier. Lors de la formation des nanoparticules, celui-ci donnera des nanoparticules de tailles plus petites, que s'il été préparé à pH=6. Ce qui est en accord même avec la définition de la surface spécifique, qui montre que le polymère à pH=5 présente une surface spécifique plus importante.

Le rayon des pores formés pour les deux matériaux est supérieur à 500Å. Cette gamme de tailles de diamètre appartient beaucoup plus à la famille des macropores.

Une étude comparative entre la surface BET et la surface cumulée calculée par la méthode BJH, peut nous fournir quelques indications complémentaires sur la forme des pores présents dans les deux matériaux (tableau 24).

Tableau 24: Surfaces spécifiques déterminées par les méthodes BET et BJH

<i>Matériaux F3</i>	<i>Surface spécifique</i> S_{BET} (m ² /g)	<i>Surface cumulée</i> S_{cum} (m ² /g)
<i>pH=5</i>	298.079	233.043
<i>pH=6</i>	116.395	93.446

Pour les deux matériaux de nanoparticules, on observe que $S_{BET} > S_{cum}$. La littérature prévoit dans ce genre d'inégalité, l'existence de pores contenant des cavités sphéroïdes, tout comme elle peut être due à l'existence non seulement des macropores, mais aussi des micropores un résultat approuvé par l'étude de **Meziti C [95]**.

Afin d'appuyer cette hypothèse, nous avons utilisé la méthode proposée par Lippens et De Boer qui consiste à tracer une courbe V_{ads} en fonction de l'épaisseur t (thickness) statique de la couche multimoléculaire adsorbée (figure 57).

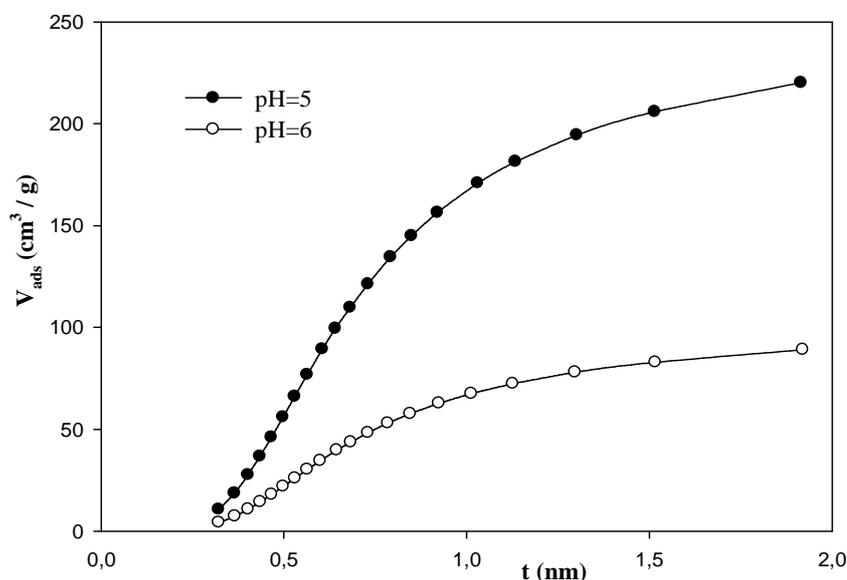


Figure 57 : Diagramme-t de la formulation F3 pour le chitosane synthétisé

L'examen des courbes précédentes obtenues sur les échantillons de nanoparticules formées à pH=5 et 6, montre que les deux courbes transformée t correspondent à la forme III de De Boer. La forme III correspond aux adsorbants microporeux.

A partir de la caractérisation texturale, on conclut que les formulations élaborées par le chitosane à pH=5 et 6 contiennent à la fois des macropores et des micropores. Ce qui explique que la tobramycine, lors de sa libération suit plus particulièrement un mécanisme de diffusion (voir chapitre I, première partie) limité par un phénomène de transport par convection dans un liquide remplissant des macropores et des micropores.

III.2 Etude de la cinétique de libération du principe actif

L'approche la plus considérée pour améliorer la biodisponibilité de la tobramycine, dans le compartiment oculaire, été son incorporation dans une matrice polymérique adhésive qui va retarder sa vitesse de libération. Sur le plan de la recherche, les hydrogels de chitosane sont très étudiés pour des applications dans les domaines biomédical et pharmaceutique. Notamment, pour la libération de molécules actives en raison de sa biocompatibilité et sa biodégradabilité.

L'élaboration des formulations à libération prolongée a pour but de diminuer la surface de contact du PA avec le milieu simulant le milieu physiologique, afin de lui conférer un effet « retard ».

Cette étude a pour but d'examiner les résultats de la libération de la tobramycine *in vitro*, afin d'évaluer la cinétique de relargage en fonction de la concentration du chitosane, à différents poids moléculaires et degrés de désacétylation, ainsi que les conditions du pH dans lequel on a dissout le polymère. Ce dernier servira par la suite à l'élaboration des différentes formulations, avec la méthode de gélification ionique sous l'influence du TPP, où nous observons trois phénomènes fondamentales pour la formation des microparticules, qui sont : solution, agrégation et opalescence de la suspension.

III.3 Vitesse de libération de la tobramycine en fonction de la concentration du chitosane

Les résultats obtenus pour le temps de libération du PA, à travers la matrice du chitosane, sont très intéressants pour retarder le relargage de la tobramycine.

Les figures suivantes illustrent la variation du temps de libération, en fonction de la concentration du chitosane et de la composition des différentes formulations, préparées dans des solutions du polymère, qui a été dissout dans l'acide acétique à 1% à pH 5 et 6.

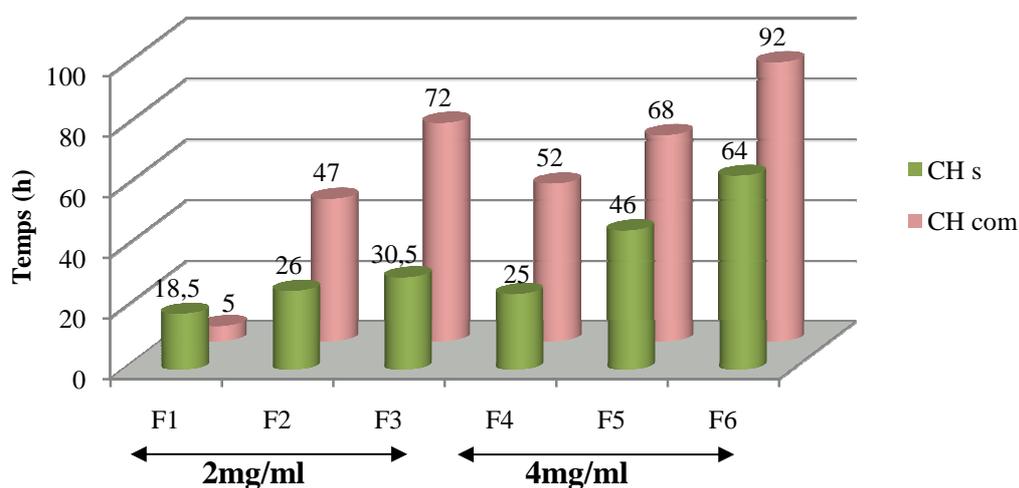


Figure 58: Variation du temps de libération pour l'ensemble des formulations (pH=5)

Où :

CHs : Chitosane synthétisé ; **CHcom** : Chitosane commercial

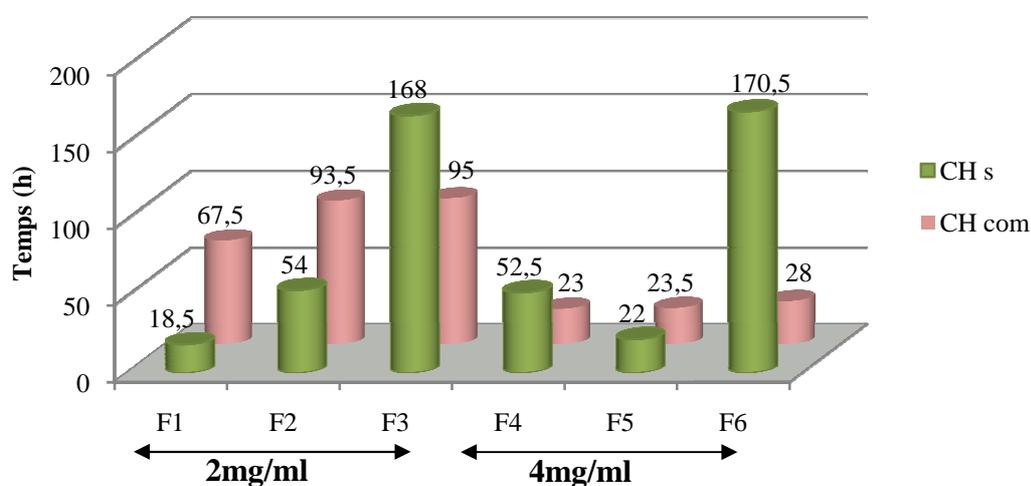


Figure 59: Variation du temps de libération pour l'ensemble des formulations (pH=6)

Les histogrammes présentés ci-dessus, montrent clairement que le temps de libération est prolongé pour l'ensemble des formulations élaborées. Il est plus important pour les formulations préparées en rajoutant du PEG (F2 et F5) et celles dans lesquelles on a incorporé le PEG et le tween80 (F3 et F6), par rapport aux temps enregistrés pour les formulations préparées uniquement à base du TPP (F1 et F4). Ceci est observé dans tous les cas étudiés et pour les pH 5 et 6 de la solution du polymère, préparée à deux concentrations 2 et 4 mg/ml.

D'après ces résultats, on montre que le temps de relargage de la tobramycine pour les solutions du chitosane (synthétisé et commercial) à pH=5, est proportionnel à la concentration de ce dernier. On remarque aussi que les temps de relargage obtenus avec le chitosane commercial, pour le même pH, sont plus prolongés.

Contrairement, pour les solutions à pH=6 du chitosane synthétisé, le temps de relargage est plus important dans les formulations F3 et F6, correspondant respectivement à 168h et 170,5h, et par comparaison avec les temps de relargage obtenus pour les solutions du chitosane commercial préparées sous les mêmes conditions, qui sont de 95h et 28h respectivement à pH 5 et 6.

III.4 Etude de l'influence de quelques paramètres sur l'encapsulation de la tobramycine

Pour mettre en évidence l'influence de certains paramètres susceptibles d'affecter le taux d'encapsulation, nous avons varié la concentration du chitosane, le pH des solutions, son poids

moléculaire et la composition des formulations. A cet effet, les différentes formulations élaborées sont introduites dans la solution de NaCl à 140mg/ml à pH=7.4 (physiologique). Le suivi de la cinétique de libération du PA, est fait par mesure de l'absorbance en fonction du temps au moyen du spectrophotomètre UV-Visible à la longueur d'onde maximale $\lambda_{\max} = 204\text{nm}$ caractéristique de la tobramycine (λ_{\max} est obtenue par balayage entre 197 et 400nm sur le spectre de la figure 60).

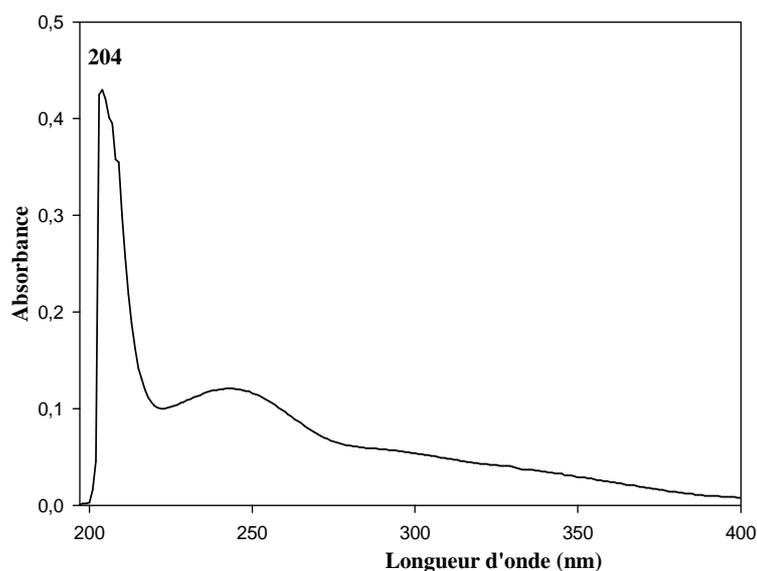


Figure 60: Spectre UV de la tobramycine dans la solution du milieu physiologique

L'estimation des concentrations du PA libéré au cours de temps est déterminée par la courbe d'étalonnage réalisée (figure 61) au préalable.

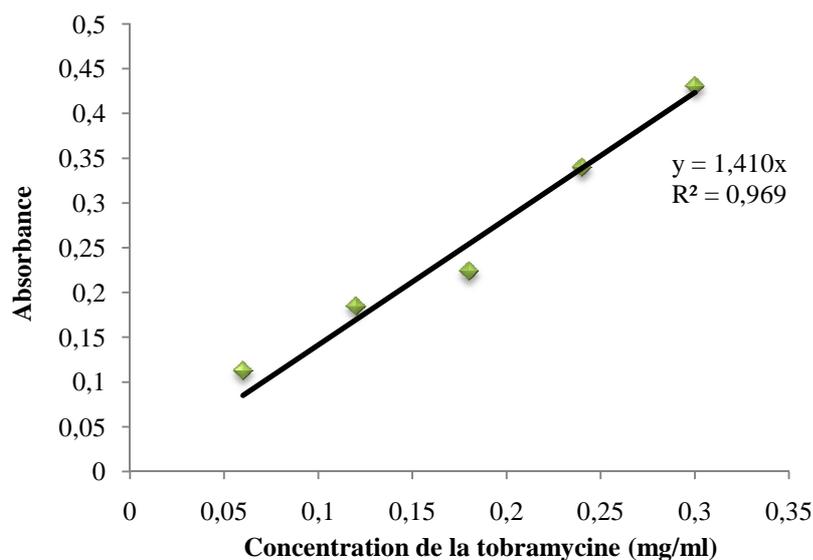


Figure 61: Courbe d'étalonnage de la tobramycine dans la solution du milieu physiologique

III.4.1 Influence de la concentration du chitosane

Les figures suivantes présentent la concentration de la tobramycine libérée de F3 et F6, en fonction de la concentration du chitosane à 2 et 4mg/ml pour les pH=5 et 6.

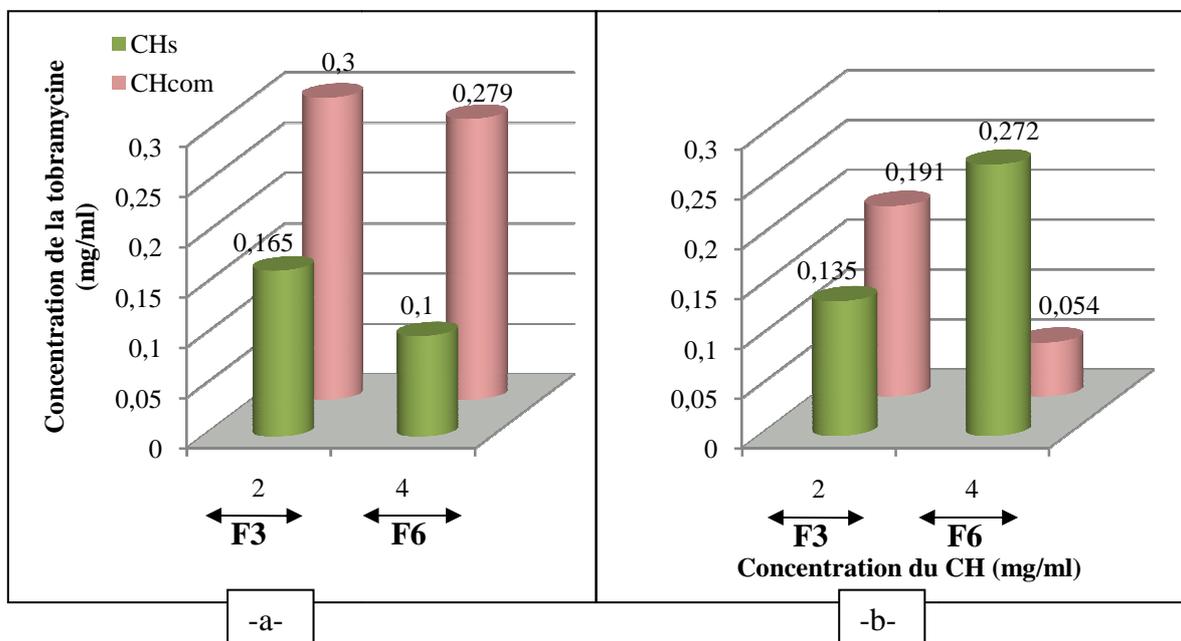


Figure 62: Cinétique de relargage de la tobramycine dans F3 et F6
a) pH=5 ; b) pH=6

L'analyse de ces histogrammes montre que pour la formulation F3 élaborée dans des solutions du polymère à pH=5, la quantité libérée du PA à une concentration du polymère de 2mg/ml, est supérieure à celle libérée à une concentration de 4mg/ml pour la formulation F6 correspondant aux deux types de chitosane.

En l'occurrence, on obtient les mêmes résultats pour les mêmes formulations citées ci-dessus, si la microencapsulation a été réalisée avec des solutions du polymère à pH=6, avec le chitosane commercial. De ce fait, on note une concentration maximale de 0.191mg/ml pour 2mg/ml en polymère, et elle décroît à 0.054mg/ml pour une quantité plus importante en polymère, soit 4mg/ml.

Cependant, avec le chitosane synthétisé nous obtenons des résultats très différents des précédents, en particulier pour la formulation F3 qui aboutit à une concentration de PA libéré estimée à 0.135mg/ml. Celle-ci augmente pour la formulation F6 et atteint une valeur optimale en PA de 0.272mg/ml. Ces résultats sont interprétés par l'effet inhibiteur que peuvent exercer les impuretés sur

la tobramycine, au sein de la solution lors de l'étape de l'encapsulation, et qui peuvent empêcher la libération du principe actif dans le milieu.

Globalement, ces résultats montrent que la quantité du PA libérée est meilleure dans le cas de faibles concentrations en polymère; donc l'augmentation de la concentration du chitosane est un facteur défavorable pour l'encapsulation de la tobramycine. Ce qui entraîne inéluctablement, la diminution de la quantité du PA libéré.

Ceci peut être interprété par l'importance de la viscosité du milieu gélifié, qui gênerait l'encapsulation du PA. En d'autres termes, Cela signifie que la grande concentration du polymère empêche le TPP, qui peut s'associer avec le chitosane par les oxygènes de ses groupements étheroxydes et alcools, d'atteindre les sites actifs (NH_3^+) situés sur les chaînes du polymère; un mécanisme qui est connu sous le nom de gélification ionique, et qui se produit par interaction électrostatique entre les charges positives du chitosane et les charges négatives du TPP, conduisant ainsi à une réticulation inter et intramoléculaires du polymère, comme on le schématiserait sur la figure 63 ci-dessous.

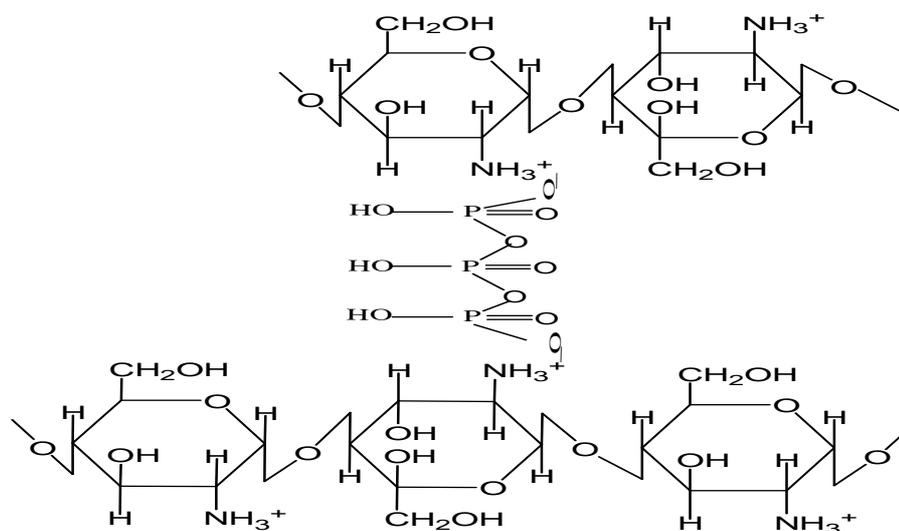


Figure 63: Schéma du mécanisme de gélification ionique du chitosane par le TPP

Cette réticulation ionique des chaînes du polymère, induisent la formation de nanoparticules.

L'ensemble des résultats est regroupé dans le tableau 25, qui présente la concentration optimale obtenue pour les différentes formulations élaborées.

Tableau 25: Concentrations de la tobramycine libérée des différentes formulations

Formulations			Concentration de la tobramycine libérée (mg/ml)			
			pH=5		pH=6	
			CHs	CHcom	CHs	CHcom
Polymère	2mg/ml	F1	0.038	0.272	0.071	0.133
		F2	0.051	0.280	0.035	0.160
		F3	0.165	0.3	0.135	0.191
	4mg/ml	F4	0.029	0.130	0.071	0.035
		F5	0.046	0.262	0.046	0.042
		F6	0.1	0.279	0.272	0.054

III.4.2 Influence du pH des solutions du chitosane

L'étude de l'influence du pH sur l'encapsulation de la tobramycine par le chitosane, a été faite en solubilisant ce dernier dans l'acide acétique à 1%, puis en ajustant le pH de ces solutions à deux valeurs 5 et 6. Le choix du pH est justifié par la stabilité du principe actif, à caractère basique, qui augmente sensiblement à ces deux valeurs de pH.

L'analyse des résultats portés sur le tableau 25 montrent, que dans le cas du chitosane commercial, les concentrations de la tobramycine libérées sont plus importantes pour toutes les formulations de ce polymère préparées à pH=5 avec deux concentrations 2 et 4mg/ml. Et ceci après comparaison avec les résultats obtenus à pH=6.

Ces résultats peuvent être interprétés par l'influence que peut exercer la solubilité du chitosane à pH acide, sur ses interactions avec la tobramycine; plus le polymère est soluble, plus le nombre de groupements de NH_3^+ , qui représentent les sites actifs, sont disponibles et plus les interactions entre le principe actif et le polymère sont importantes. En conséquence, la quantité qui va être encapsulée en antibiotique sera elle aussi plus importante.

La valeur du pH a aussi un impact sur la dimension des microparticules formées : par exemple la quantité libérée pour la composition F3, dans le cas du chitosane synthétique, préparé à pH=5, est de 0.165mg/ml et elle est de 0.135mg/ml seulement pour la même formulation, lorsque le pH du chitosane est de 6. Nous pensons que cela est dû à la dimension faible des microparticules formées dans le premier cas, contrairement au second cas. Les résultats de l'analyse BET le confirme par les valeurs des surfaces spécifiques, pour F3 à pH=5 elle est de $S_{\text{BET}}=298.079\text{m}^2/\text{g}$ qui est supérieure à celle de la même formulation à pH=6, où la valeur est $S_{\text{BET}}=116.395\text{m}^2/\text{g}$.

Ainsi, les temps de libération obtenus sont en accord avec les précédents résultats, pour le chitosane préparé à pH=5, le temps de libération est inférieur et estimé à 30.5h, alors qu'il est très élevé de 168h, lorsque le chitosane est solubilisé à pH=6. Ce qui peut être interprété, par la faible dimension des particules, permettant au solvant de diffuser plus rapidement au sein du polymère, et favorisant ainsi la solubilisation de la tobramycine.

III.4.3 Influence du poids moléculaire du chitosane

Sur les figures suivantes, on illustre l'influence du poids moléculaire sur la quantité libérée de la tobramycine après encapsulation, des différentes formulations :

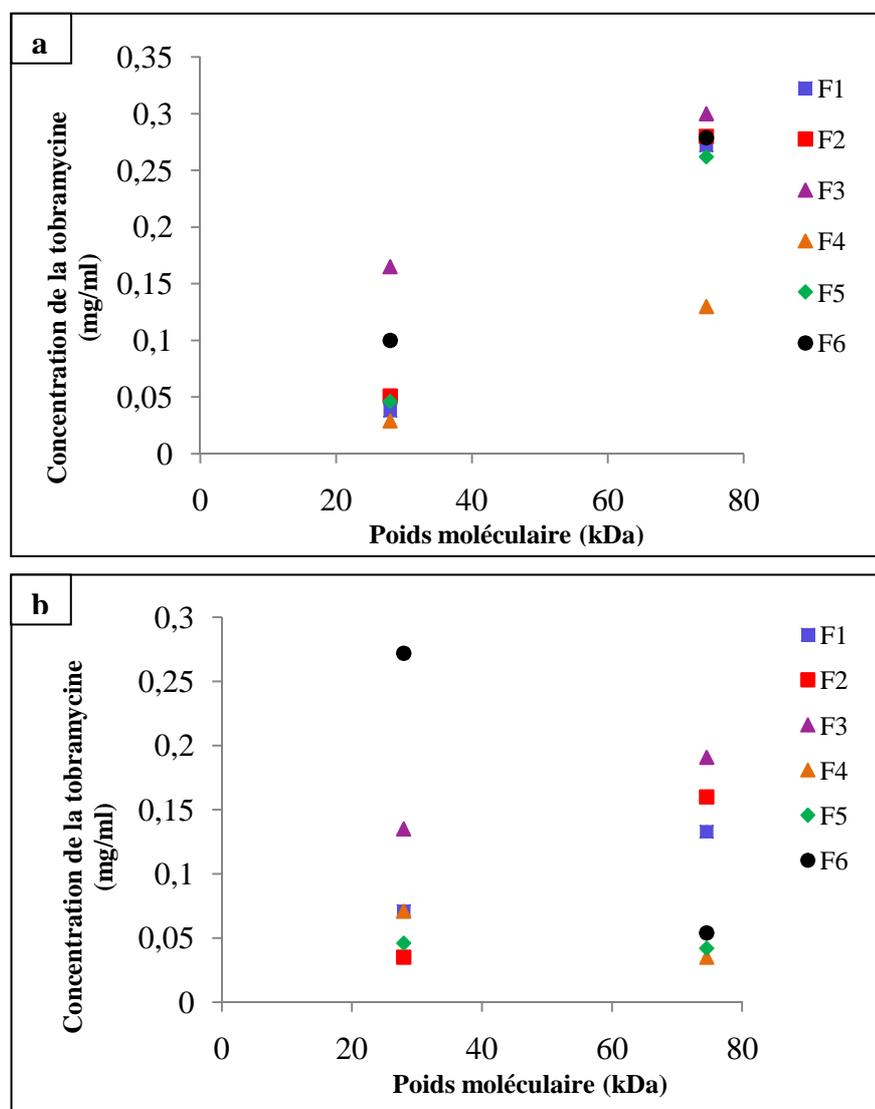


Figure 64: Concentration de la tobramycine en fonction du poids moléculaire
a) pH=5 ; b) pH=6

Ces figures révèlent que la quantité de la tobramycine libérée est proportionnelle au poids moléculaire du chitosane, et ceci pour toutes les formulations préparées avec les solutions du chitosane synthétique et commercial, à 2 et à 4mg/ml et à pH=5 et 6. A l'exception faite des formulations F4, F5 et F6, élaborées à 4mg/ml et à pH=6, où nous observons sur la figure 65b l'effet inverse; c'est-à-dire que l'augmentation du poids moléculaire engendre la diminution de la quantité encapsulée, et de ce fait la concentration libérée en tobramycine sera plus faible.

Dans cette optique, les travaux de **Wu Y[96]** prévoit l'augmentation du taux d'encapsulation lorsque le poids moléculaire augmente. Ce dernier résultat est la conséquence des impuretés que contient le chitosane synthétisé, comme il a été montré par analyse thermogravimétrique et dans l'étude antibatérienne. Celles-ci peuvent former des blocs permettant l'emprisonnement du principe actif, et participe ainsi à l'augmentation de la quantité libérée après pénétration de l'eau à l'intérieure des paricules.

La grande capacité d'encapsulation observée avec le chitosane de plus grand poids moléculaire, est attribuée surtout à la longueur de ces chaînes sur lesquelles sont distribués les groupements amino, et qui peuvent interagir avec le principe actif par des liaisons de type Van der Walls et hydrogènes, renforcées par le polymère existant à l'état d'hydrogel ionique, induit par la présence du TPP.

III.4.4 Influence de la composition des différentes formulations

Les courbes de variation présentées dans les figures 65, 66, 67 et 68, montrent la concentration de la tobramycine libérée en fonction du temps pour les différentes formulations. Les profils des courbes cinétiques mettent en évidence l'existence d'un mécanisme prédominant limité par un processus de diffusion. L'observation de plusieurs paliers montre que la diffusion se produit en plusieurs étapes, lors de laquelle le principe actif doit franchir plusieurs barrières, d'un édifice plus ou moins ordonné, représentées par les différentes fibres du polymère.

L'évaluation *in-vitro* de tels systèmes montre que la libération de la tobramycine (PA hydrosoluble) est croissante dans le temps. Elle est précédée par un temps très court d'inertie, correspondant à une période du temps nécessaire pour permettre d'abord le passage du soluté à travers la matrice polymérique, puis celle-ci est suivie d'une libération très rapide au départ (pendant les premières minutes) du PA, qui devient par la suite progressive et plus lente (quelques heures) dans le temps et tend vers des valeurs constantes (palier).

Pour l'ensemble des formulations, la quantité de la tobramycine libérée pour les microparticules élaborées avec le mélange chitosane- PEG- tween80, est plus importante que lorsque celles-ci sont élaborées soit avec le mélange chitosane-PEG ou bien avec le chitosane seul. D'après **Caliceti et al [97]**, l'ajout du PEG augmente le taux d'encapsulation du principe actif en réduisant la dimension des microparticules. Ce phénomène s'explique par l'augmentation de la tension de charge créée par des liaisons de type hydrogène, d'une part entre le doublet libre de l'oxygène des

groupements $-OH$ du chitosane et les hydrogènes H du PEG, et d'autre part par des interactions du doublet libre de l'oxygène du PEG et les hydrogènes répartis sur la chaîne du chitosane (amino). Tandis que l'ajout d'un tensioactif anionique le tween80 a pour rôle d'intensifier le nombre de ponts de réticulation, ce qui favoriserait la réduction de la taille des microparticules.

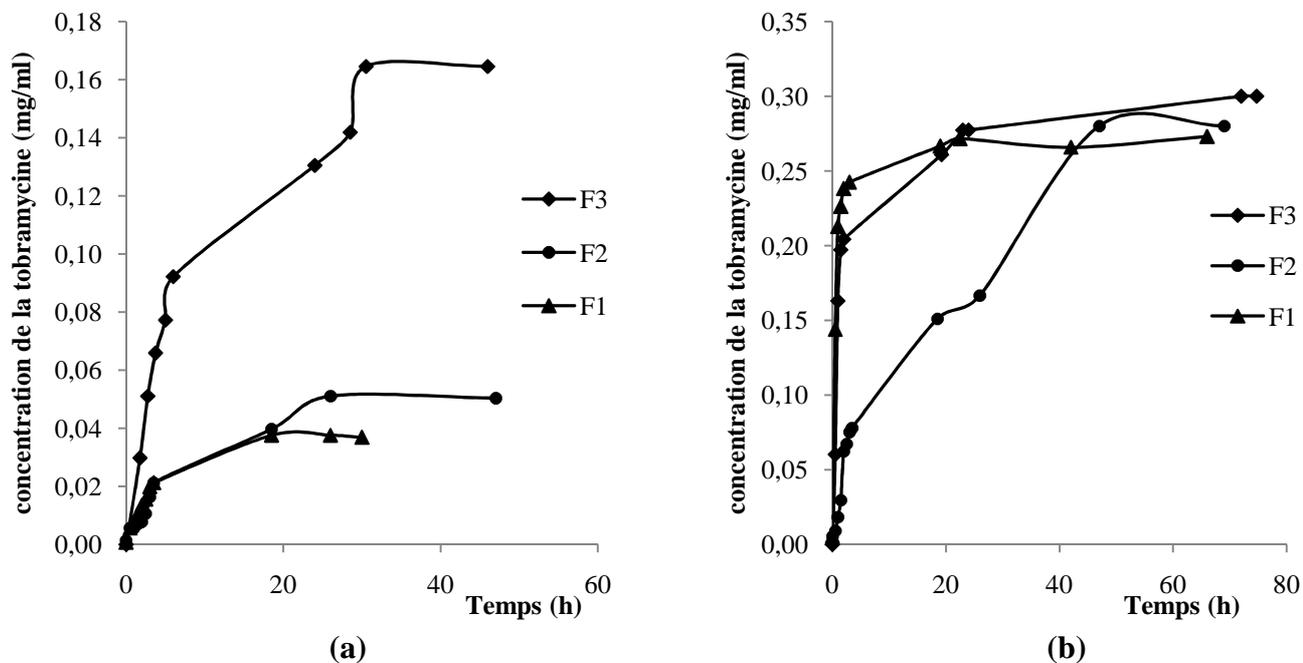


Figure 65: Cinétique de relargage de la tobramycine des formulations F1, F2 et F3 à pH=5 ; a) CHs, b) CHcom

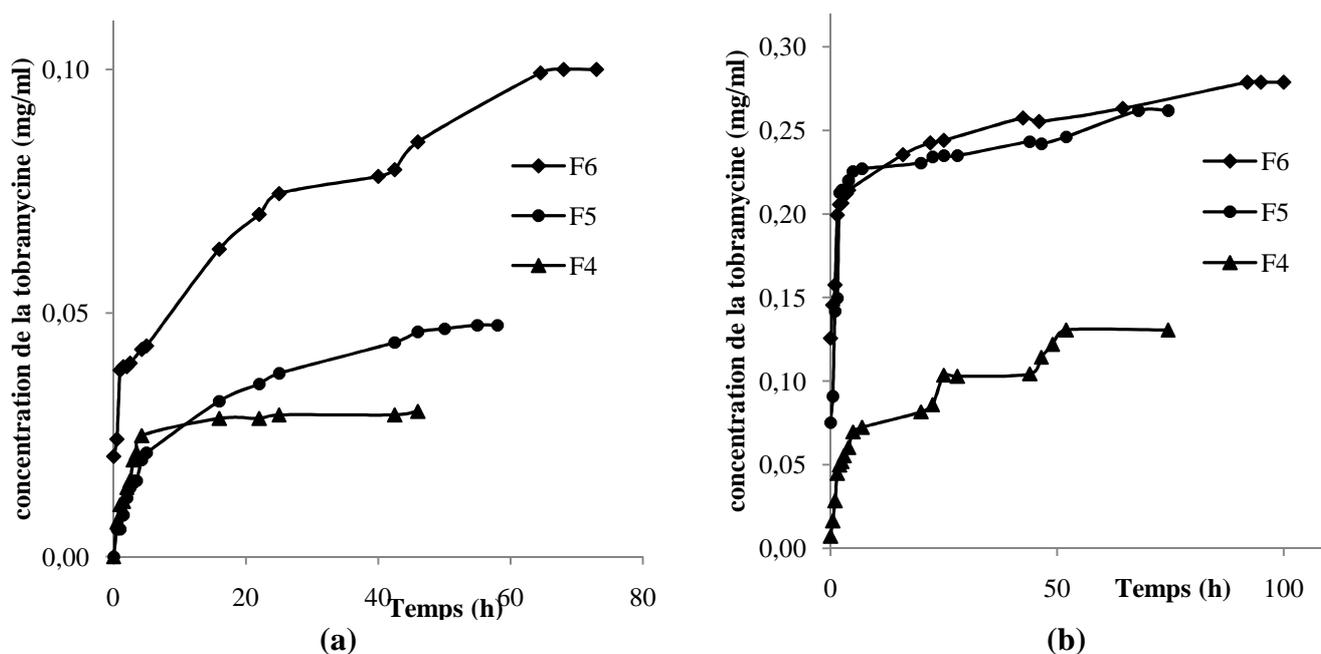


Figure 66: Cinétique de relargage de la tobramycine des formulations F4, F5 et F6 à pH=5 ; a) CHs, b) CHcom

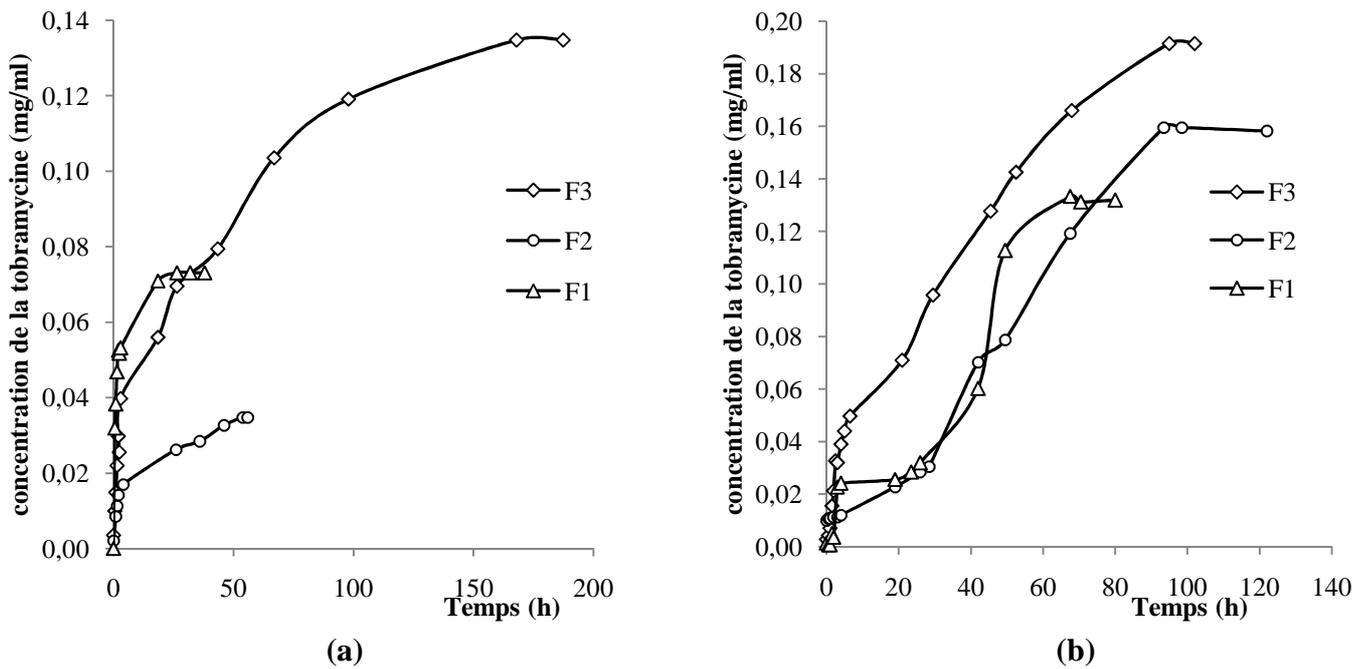


Figure 67: Cinétique de relargage de la tobramycine des formulations F1, F2 et F3 à pH=6 ;
a) CHs, b) CHcom

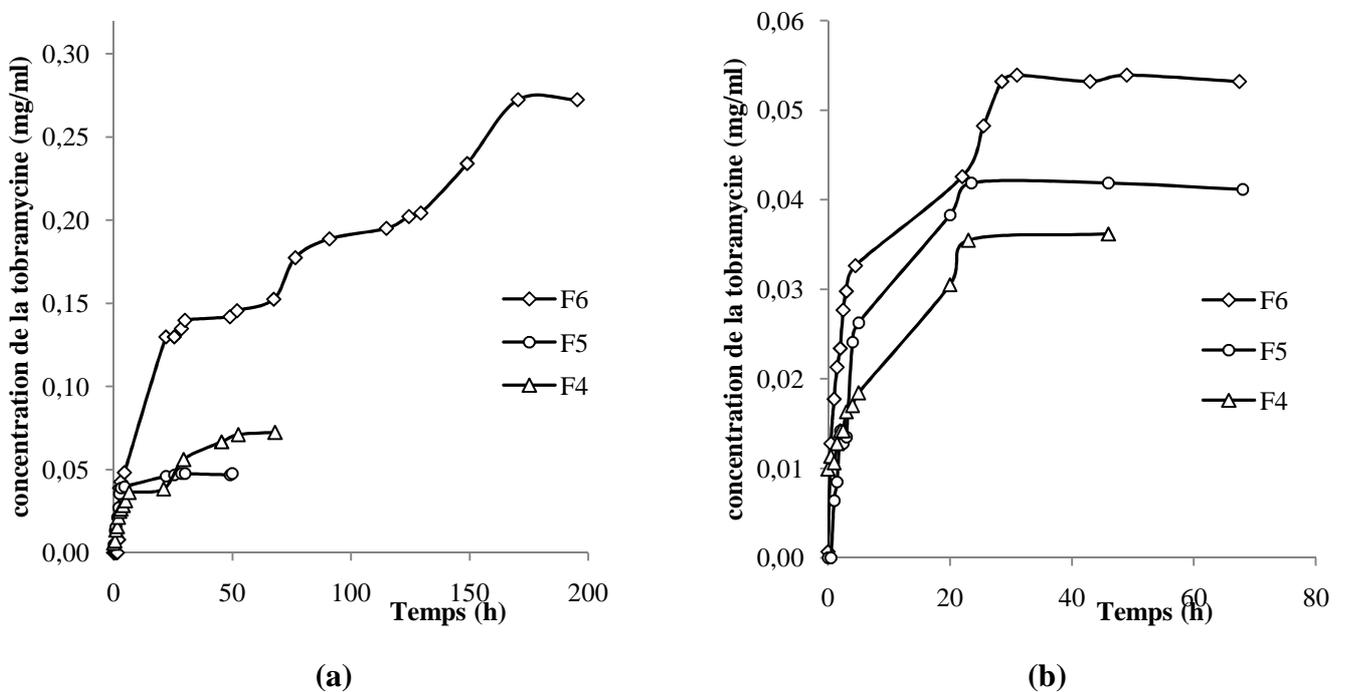


Figure 68: Cinétique de relargage de la tobramycine des formulations F4, F5 et F6 à pH=6 ;
a) CHs, b) CHcom

III.5 Mécanisme de libération de la tobramycine

Selon **Gombotz et al [98]**, la libération d'un principe actif hydrophile s'effectue généralement en deux phases; la première correspond à la solubilisation et à la diffusion du principe actif situé à proximité de la surface, alors que la deuxième survient lors de l'érosion du centre du polymère, qui libère les molécules emprisonnées. Il est possible également d'avoir un troisième mécanisme de libération, qui fait intervenir les micropores remplis d'eau formés lors du gonflement de la matrice polymérique.

Le chitosane est un polymère hydrophile et non soluble au pH de la solution physiologique (pH=7.4). Donc l'hypothèse de la libération de la tobramycine par érosion est rejetée. En revanche, la pénétration du solvant entre les chaînes du polymère provoque son gonflement, et solubilise ainsi le principe actif. Vu que la tobramycine est une molécule à caractère basique et hydrosoluble, le mécanisme de la libération proposé, est modulé par une étape de dissolution à travers les macropores et les micropores, ou bien aussi dans l'espace inclus entre les chaînes polymériques formé par le gonflement du chitosane.

Afin de décrire le mécanisme qui gouverne plus la libération de la tobramycine, nous utilisons l'équation proposée par **Peppas et al [23]** (équation 8), par laquelle le calcul de l'exposant caractéristique de libération 'n' nous renseigne sur le type du processus de diffusion.

Chien-Chi L et Andrew T. M [99] affirment que pour les valeurs de n égales à 0.43, à 0.45 et à 0.5, un mécanisme de libération de type fickien (diffusion entre les chaînes macromoléculaires du polymère) et pour des valeurs de 0.85, 0.89 et 1, il correspond beaucoup plus à une diffusion de type non fickien (diffusion par gonflement/relaxation du polymère). Quant à **Grassi M. et Grassi G. [100]** ils proposent que pour les valeurs de n : 0.43, 0.45 et 0.5, le relargage est régi par une diffusion de type fickien, et pour $n > 0.5$ la diffusion du principe actif est non fickienne.

La linéarisation de l'équation 8 a permis de déterminer les valeurs de l'exposant n pour les différents profils de libération, et pour les fractions de la tobramycine libérées inférieures à 60%. Les résultats obtenus sont portés sur les tableaux 26, 27, 28 et 29 qui suivent :

Tableau 26: Valeurs de l'exposant n déterminées pour les formulations du CHs dissout à pH=5

Formulations	2mg/ml			4mg/ml		
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
n	0.704	0.708	0.888	0.476	0.649	0.227
R^2	0.980	0.719	0.980	0.976	0.933	0.860

Tableau 27: Valeurs de l'exposant n déterminées pour les formulations du CHs dissout à pH=6

Formulations	2mg/ml			4mg/ml		
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
n	0.263	0.493	0.430	0.460	0.492	0.625
R^2	1	0.93	0.924	0.856	0.906	0.798

Tableau 28 : Valeurs de l'exposant n déterminées pour les formulations du CHcom dissout à pH=5

Formulations	2mg/ml			4mg/ml		
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
n	0.563	0.689	1.436	0.554	0.475	0.114
R^2	1	0.855	1	0.923	0.925	1

Tableau 29: Valeurs de l'exposant n déterminées pour les formulations du CHcom dissout à pH=6

Formulations	2mg/ml			4mg/ml		
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
n	0.918	0.417	0.802	0.239	0.869	0.469
R^2	0.785	0.804	0.879	0.868	0.893	0.995

L'examen des résultats obtenus pour les différentes formulations élaborées, avec le chitosane synthétique et le chitosane commercial, qui ont été dissout à pH=5 et 6 dans l'acide acétique, montre clairement que les valeurs de n dépendent du pH de la solution dans laquelle le polymère est dissout.

Pour toutes les formulations élaborées avec les deux chitosanes à pH=5, les valeurs de n varient majoritairement de 0.5 à 1. Simulant ainsi un mécanisme de libération de type non fickien, dû à un phénomène de relaxation/gonflement, qui est induite grâce à la grande hydrophilie que possède

le chitosane. Au niveau moléculaire, le phénomène de relaxation s'amorce en présence de l'agent pénétrant.

Dans le cas où ces formulations sont élaborées avec du chitosane dissout à pH=6, nous observons un autre mécanisme de diffusion qui est gouvernée par la loi de fick du principe actif à travers les chaînes macromoléculaires du polymère.

Nous pensons que la prédominance de la diffusion non fickienne dans le cas où le chitosane est dissout à pH=5, est dû à la faible dimension des nanoparticules. Ce qui permet au principe actif de diffuser majoritairement à travers les micropores et les macropores. Lorsque le chitosane est dissout à pH=6, les nanoparticules formées sont plus volumineuses car le nombre de groupements NH_3^+ , qui rentre dans le mécanisme de gélification par le TPP, devient plus faible. Par conséquent, les points de réticulation sont éloignés les uns des autres, ce qui laisse un espace libre plus important entre les chaînes du polymère, d'où diffuse la tobramycine au sein de la solution.

III.6 Rôle de la température de transition vitreuse (Tg) du chitosane et du PEG dans la libération de la tobramycine

Dans le même contexte de libération contrôlée, la température de transition vitreuse (Tg) est un paramètre très important, lors de l'interprétation du relargage des molécules actives.

Dans notre cas, la température du milieu physiologique (température ambiante) est inférieure à la température de la transition vitreuse théorique du chitosane, qui est normalement comprise dans l'intervalle [140-150C°]. Dans ce domaine, les chaînes du chitosane restent figées dans la matrice, ce qui engendre une pénétration très lente des molécules d'eau à l'intérieur de la matrice. Ce phénomène explique la libération prolongée de la tobramycine pouvant s'étendre à plusieurs jours.

Dans notre étude, les formulations F2, F3, F5 et F6 contiennent à la fois du chitosane et du PEG. Dans un mélange complètement miscible des deux polymères qui forment une phase unique, une seule et même température Tg apparaîtra, et qui s'insère entre les valeurs de Tg des deux polymères purs pris séparément. De plus, la Tg du mélange devrait obéir à l'équation de Fox (Voir annexe) décrivant la relation de la Tg du mélange en fonction de sa composition et des Tg respectives des polymères purs. La Tg de chaque polymère évolue et est affectée par celle de l'autre polymère. En d'autres termes, elle dépend de la composition. Et comme la Tg du PEG ($56^\circ\text{C} < \text{Tg} < 60^\circ\text{C}$) est supérieure à la température du milieu physiologique, on peut déduire que la Tg du mélange est aussi supérieure à celle du milieu. Ce qui nous permet de conclure, que les chaînes des deux polymères sont figées, et nous observons là aussi une libération prolongée pendant plusieurs jours.

III.7 Conclusion

La préparation des systèmes à libération prolongée à base du chitosane, dissout dans l'acide acétique à pH=5, améliore la surface spécifique et le volume poreux en réduisant la taille des particules, par rapport aux systèmes préparés dans les mêmes conditions à pH=6. L'ajout de tensioactifs tels que le PEG et le tween80 réduit davantage la dimension des particules.

La concentration du polymère entrave l'encapsulation et la libération contrôlée de la tobramycine. Ce qui justifie le temps de relargage plus prolongé, lorsque les formulations sont élaborées dans des solutions plus concentrées en polymère. Par contre, l'utilisation d'un polymère à haut poids moléculaire fournit plus de sites actifs, ce qui augmente le taux d'encapsulation.

Les résultats de la cinétique de libération de la tobramycine montrent que son relargage dépend du pH de la solution dans laquelle le chitosane est dissout. Les valeurs de l'exposant n sont comprises entre 0.5 et 1, pour les formulations préparées avec le chitosane dissout à pH=5. Ce qui entraîne une libération suivant un mécanisme non fickien, due à un phénomène de gonflement/relaxation du polymère, à travers les macropores et les micropores. Par contre, dans le cas où le chitosane est dissous dans une solution à pH=6, l'exposant diminue ($n < 0.5$) et la libération suit la loi de fick, par diffusion du principe actif à travers les chaînes macromoléculaires.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion _____ **125**

CONCLUSION

L'objectif de cette étude consiste à élaborer des formulations à effet retard à base de tobramycine (principe actif) et du chitosane (polymère) et étudier par la suite la cinétique de libération de ce principe actif.

Les carapaces de crevettes ont servi de source pour la synthèse du chitosane après une succession de plusieurs étapes : la déminéralisation, la déprotéinisation suivit d'un blanchiment par un mélange acétone/éthanol complété par un agent oxydant le peroxyde d'hydrogène. 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 50%.

La masse molaire et le degré de désacétylation du chitosane ont été déterminés par les méthodes viscosimétrique et potentiométrique qui sont estimés à 27,95kDa et 88,72% respectivement, par comparaison avec un chitosane commercial utilisé comme témoin, de masse moléculaire 74,578kDa et caractérisé par un degré de désacétylation de 64,12%.

Les caractérisations des deux polymères et du principe actif par IRTF, ATG/DTG, MEB et DRX ont abouti à un ensemble de résultats, qui ont montré que le chitosane synthétisé et commercial ainsi que la tobramycine présentent des structures chimiques, des effets thermiques, et des morphologies à dominance fibreuse et distinctes.

Une étude de l'activité antibactérienne du chitosane (CH) et du chitosane associé à la tobramycine a été réalisée vis-à-vis des germes de *Staphylocoque aureus* (S220). Des tests sur gélose ont fait l'objet de cette étude, au moyen de la technique des puits à différentes concentrations ; 0.5, 1 et 1.5% du polymère préparé dans l'acide acétique à 1% et pour deux valeurs de pH, 5.8 et 6.2. Les résultats obtenus pour les zones d'inhibition révèlent que le chitosane, à différents poids moléculaires, concentrations et degré de désacétylation associé à la tobramycine, améliore nettement l'activité antibactérienne à pH= 5,8 et à faible concentration. Ceci est dû aux propriétés physico-chimiques du polymère. Plus le pH diminue plus la solubilité augmente, grâce à la protonation des

groupements NH_2 du chitosane, et plus les chaînes du polymère seront mieux solvatées et peuvent ainsi se mouvoir plus aisément au sein de la solution, pour atteindre la cible (germes).

Afin de contrôler la vitesse de libération de la tobramycine dans le milieu environnant, des formulations de tobramycine/chitosane (synthétique et commercial) ont été préparées par la méthode de gélification ionique du chitosane, avec le tripolyphosphate de sodium (STPP) à deux concentrations ; 2mg/ml pour les formulations F1, F2 et F3 et 4mg/ml pour les formulations F4, F5 et F6 et à deux pH (5 et 6) du polymère. Les compositions F2 et F5 contiennent quant à elles un autre polymère, le polyéthylène glycol PEG, tandis que F3 et F6 contiennent les deux tensioactifs le PEG et le tween80.

La cinétique de libération de la tobramycine a été suivie dans un milieu physiologique de larmes artificielles, préparé à base de chlorure de sodium NaCl à pH=7.4. Les résultats de la cinétique ont montré que le relargage de la tobramycine dépend de la concentration du chitosane, du pH de la solution dans laquelle il est solubilisé, de son poids moléculaire et de la composition des formulations.

- L'augmentation de la concentration du polymère engendre une solidification du milieu et réduit le taux d'encapsulation de la tobramycine. On obtient pour le chitosane synthétique à pH=5 une concentration de F3 de 0.165mg/ml à la concentration de 2mg/ml du polymère, et elle diminue à 0.1mg/ml dans F6 lorsqu'on augmente la concentration du polymère à 4mg/ml.

- La préparation des systèmes à libération prolongée à base du chitosane dissout dans l'acide acétique à pH=5 et 6, montre que les formulations élaborées à pH=5 libèrent plus le principe actif, ce qui est dû à la réduction de la taille des nanoparticules.

- Le chitosane commercial possède un poids moléculaire plus important, ce qui augmente davantage les sites actifs qui vont interagir avec le principe actif et améliorer le taux d'encapsulation. Par conséquent la quantité libérée sera importante. La concentration libérée pour F3, respectivement pour les chitosanes synthétique et commercial à pH=5, est 0.165 et 0.3mg/ml.

- L'ajout du PEG et le tween80 permet d'augmenter le taux d'encapsulation et de prolonger le temps de libération de la tobramycine en réduisant la dimension des nanoparticules formées.

Le modèle de la cinétique de libération répond à une loi de type : $f(t)=k t^n$, elle été utilisée pour décrire le mécanisme de libération. L'exposant de libération n calculé pour l'ensemble des formulations varie en fonction du pH de la solution du polymère. Les valeurs de n, comprises entre 0.5 et 1 pour les formulations préparées avec le chitosane dissout à pH=5 permis de vérifier que le profil simulé de la libération contrôlée est dominé par un profil de type non fickien, dû à l'existence du phénomène de gonflement/relaxation du polymère, à travers les macropores et les micropores.

Contrairement, à pH=6 l'exposant $n < 0.5$, montre que le profil de libération obéit plutôt à la loi de fick, autrement dit la tobramycine se libère à travers l'espace existant entre les chaînes macromoléculaires du polymère.

PERSPECTIVES

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 dans les systèmes à libération prolongée pour d'autres principes actifs administrés par voie oculaire, afin de maintenir la biodisponibilité nécessaire aussi longtemps que possible et dans la marge thérapeutique que le traitement le recommande. A cet effet nous proposons les perspectives suivantes :

- 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 et dans des milieux plus 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.

- Pour améliorer la pureté du polymère synthétisé, il faut appliquer des méthodes d'extraction liquide-solide, dans le but d'éliminer les impuretés qui sont les protéines, les β -carotènes, et les minéraux.

- Rechercher une forme d'administration plus adéquates aux formulations proposées dans cette étude.

- Procéder à une étude pharmacologique, pour déterminer la quantité qui doit être encapsulée, pour que la concentration sanguine reste dans la marge thérapeutique.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

[1]:Lahnin A.

Les formes galéniques à libération modifiée. Thèse doctorat en pharmacie. Université Cheikh Anta Diop de Dakar, 2002.

[2]: Chellat F.

Biocompatibilité, Biodégradation et influence de la stérilisation sur le complexe chitosane-xanthane. Thèse de Métrise des Sciences Appliquées (M.SC.A) en génie biomédical. École polytechnique de Montréal, 1999.

[3]: Ratner B.D.

Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis maround implant drug release systems. Journal of Controlled Release 78, pp. 211-218, 2002.

[4]: Park H and Park K.

Biocompatibility issues of implantable drug delivery systems. Pharmaceutical Research 13, pp. 1770-1776, 1996.

[5] : Danckwerts M et Fassihi A.

Implantable controlled release drug delivery systems: a review. Drug Development and Industrial Pharmacy 17, pp. 1465-1502, 1991.

[6]: Dash A.K et Cudworth II G.C.

Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 40, pp.1-12, 1998.

[7] : Pulapura S et Kohn J.

Trends in the development of bioresorbable polymers for medical applications. Journal of Biomaterials Applications 6, pp. 216-250, 1992.

[8]: Chien Y.W.

Fonndamentals of rate-controlled drug delivery, in: Y.W. Chien (Ed.), Novel drug delivery systems, Marcel Dekker, New York, pp.43- 138, 1992.

[9]: Désévaux C. Thèse pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor en sciences pharmaceutiques. Développement d'un implant solide biodégradable à base d'amidon réticulé à teneur élevée en amylose, pour la libération contrôlée d'un principe actif. Université de Montréal, 2002.

[10]: Iskandar M.

Diffusion dans les Matrices Hydrophiles à Base d'Amylose Réticulé : Caractérisation et Application à la Libération Contrôlée de Médicaments. Thèse en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en sciences pharmaceutiques. Université de Montréal, 1998.

[11]: Theewes F and Bayne W.

Dosage form index: an objective criterion for evaluation of controlled release drug delivery ystems, J. Pharm. Sci 66, pp. 1388-1392, 1977.

[12]: Baker R.W.

Controlled release of biologically active agents, John Wiley & Sons, New York, 1987.

[13] : Veena B.V, Pajandera J, Zuurmanb K, Lappalainen R, Posod A, Frijlinkb H.W and Ketolainen J.

The effect of powder blend and tablet structure on drug release mechanisms of hydrophobic starch acetate matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 61, pp. 149-157, 2005.

[14]: Conti S, Gaisford S, Buckton G, Maggi L and Conte U.

The role of solution calorimetry in investigation controlled-release processes from polymeric drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 6, 2007.

[15]: Proikakis C.S, Tarantili P.A and Andreopoulos A.G.

The role of polymer/drug interactions on the sustained release from poly (DL-Lactic acid) tablets. *European Polymer Journal* 42, pp. 269-327, 2007.

[16]: Schierholz J.M.

Drug delivery devices to enhance performance and improve outcome. *Drug Delivery Systems and Sciences* 7, pp. 403-437, 2001.

[17]: Idrissou Y.

Diffusion d'un principe actif la Metformine à partir d'un polymère polyacide lactique. Mémoire présentée à la faculté de la technologie de l'université A/M de Bejaia en vue d'obtention du grade de magistère en Génie des polymères. 2008.

[18]: Li V.H.K, Robinson J.R and Lee V.H.L.

Influence of drug properties and routes of drug administration on the design of sustained and controlled release systems, in *Controlled drug delivery*. Marcel Dekker Inc., New York, pp.3-94, 1978.

[19]: Liversidge G.G and Cundy K.C.

Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *Int. J. Pharm* 125, pp. 91-97, 1995.

[20]: Beerrmann B, Kellstrom K and Rosen A.

Metabolism of propantheline in man. *Pharmacol. Ther* 13, pp. 212, 1972.

[21]: Doelker E.

Cinétique et mécanismes de la libération contrôlée à partir des systèmes polymériques, dans : *Formes pharmaceutiques nouvelles: Aspects technologique, biopharmaceutique et médical. Technique et Documentation (Lavoisier)*, Paris, pp. 65-174, 1985.

[22]: Jalil R and Nixon J.R.

Biodegradable poly (lactic acid) and poly (lactide-co-glycolide) microcapsules : problems associated with preparative techniques and release properties. *Journal Microencapsulation* 7 (3), pp. 297-325, 1990.

[23]: Peppas N.A, Bures P, Leobandung W and Ichikawa H.

Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm* 50, pp. 27–46, 2000.

[24]: Colombo P, Bettini R, Massino G, Santi P, De Ascentiis A and Peppas N.A.

Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. *Journal Control Release* 39, pp. 231-237, 1996.

[25]: Te Wierik G.H.P, Bergsma J, Arends-Scolte A.W, Boersma T, Eissens AC and Lerk C.F.

A new generation starch products as excipient in pharmaceutical tablets. I. Preparation and binding properties of high surface area potato starch products. *International Journal of Pharmaceutics* 134, pp. 27-36, 1996.

[26]: Nigalaye AG, Adusumilli P and Bolton S.

Investigation of prolonged drug release from matrix formulations of chitosan. *Drug Dev. Ind. Pharm* 16, pp. 449, 1990.

[27]: Korsmeyer R.W.

Diffusion controlled systems: Hydrogels, in *Polymers for controlled drug delivery*, P.J. Tarcha (Ed), CRC Press, Florida, pp. 15-38, 1991.

[28]: Higuchi T.

Mechanism of sustained-action medication: theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in inert matrices, *J. Pharm. Sci* 52, pp. 1145-1149, 1963.

[29]: Peppas N.A and Bindschaedler C.

Délivrance des principes actifs médicamenteux II. Aspects fondamentaux de la diffusion des principes actifs dans les polymères, *S.T.P. Pharma* 1, pp. 121-127, 1985.

[30]: Baker R. W and Lonsdale H.K.

Controlled release: mechanisms and rates, in *Controlled release of biologically active agents: advances in experimental medicine and biology*, Tanquary A.C. and Lacey R.E., Eds., Plenum Press, New York, pp. 15-7, 1974.

[31]: Ségot-Chicq S, Teillaud E et Peppas N.A.

Les dispositifs à libération contrôlée pour la délivrance des principes actifs médicamenteux I. Intérêt et applications. *S.T.P. Pharma* 1, pp. 25-36, 1985.

[32]: Ron E and Langer R.

Erodible systems, in *Treatise on Controlled Drug Delivery. Fundamentals. Optimization. Applications*, Kydonieus A. (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 199-224, 1992.

[33] : Jaouen D.

Chitine, Chitosane et Dérivés. PhD Thèse en pharmacie, Université d'Angers, Angers (France), 1994.

[34]: Peter M.G.

Chitin and chitosan from animal sources. *Biopolym* 6, pp. 481-574, 2002.

[35]: Tolaimate A, J. Desbrieres M, Rhazi and Alagui A.

Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polym* 44, pp. 7939-7952, 2003.

[36]: Mekahlia S

Le complexe chitosane-cuivre (ii) : synthèse, caractérisation et étude de l'effet de sa structure sur son activité antibactérienne. Mémoire de magister. Université de Saad Dahlab de Blida. 2007.

[37]: Aslak E.

Characterisation of chitin and a study of its acid-catalysed hydrolysis. Thesis for the degree of philosophiae doctor. Norwegian university of science and technology. 2007.

[38]: Rinaudo M.

Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science 31, pp. 603-632, 2006.

[39]: Peter M.O-O, Marcin H.S and Martin G. P.

Characterisation of chitosan from blowfly larvae and some crustacean species from Kenyan marine waters prepared under different conditions. Western Indian Ocean Journal. Mar. Sci. vol 4, N°1, pp. 99-107, 2005.

[40]: Percot A, Viton C and Domard A.

Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells. Biomacromol 4, pp. 12-18, 2003.

[41] : Mahlous M, Tahtat D, Benamer S and Khodja N.

Gamma irradiation-aided chitin/chitosane traction from prawn shells. Beam Interactions with Materials and Atoms 265, pp. 414-417, 2007.

[42] : No H.K and Meyers S.P.

Preparation and characterization of chitin and chitosan. Review J Aquatic Food Prod. Tech 4, pp. 27-52, 1995.

[43] : Shahidi F. and Synowiecki J.

Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoectes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. J. Agric. Food Chem 39, pp. 1527-1532, 1991.

[44] : No H.K, Meyers S.P and Lee K.S.

Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. J. Agric. Food Chem 37, pp. 575-579, 1989.

[45]: Fox D.L.

Chitin-bound keto-carotenoids in a crustacean carapace. Comp. Biochem. Physio 44B, p 953, 1973.

[46]: Kurita K.

Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. Mini-Review. Marine Biotechnology, pp. 180-8633, 2006.

[47]: Ravi Kumar M.N.V.

A review of chitin and chitosan applications. React. Function. Polym 46, pp. 1-27, 2000.

[48]: Avadi M.R, Sadeghi A.M.M, Tahzibi A, Bayati Kh, Pouladzadeh M, Zohuriaan-Mehr M.J and Rafiee-Tehrani M.

Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: Synthesis, characterization and antibacterial effects. European Polymer Journal 40, pp. 1355-1361, 2004.

[49]: Seng J.M.

Chitine, chitosane et dérivés: de nouvelles perspectives pour l'industrie. Biofutur 9, pp.40-44,1988.

[50]: Shahidi F, Arachi J.K.V and Jeon Y.J.

Food applications of chitin and chitosans. Trends Food Sci. Tech **10**, pp. 37-51, 1999.

[51]: Chatelet C, Damour O and Domard A.

Influence of the degree of acetylation on some Biological properties of chitosan Films. Biomater 22, 261-268, 2001.

[52] : Muzzarelli R.A.A.

Chitin; Pergamon: Oxford, 1977.

[53] : Fernandez C.M, Heinamaki J, Rasanen M, Maunu S.L, Karjalainen M, Nieto Acosta O.M, Iraizoz Colarte A and Yliruusi J.

Solid-state characterization of chitosans derived from lobster chitin. Carbohydrate Polymers 58, pp. 401-408, 2004.

[54]: Pelletier A, Lemire I, Sygusch J, Chornet E and Overend R.P.

Chitin Chitosan Transformation by Thermomechanicochemical Treatment Including Characterization by Enzymatic Depolymerization. Biotechnology and Bioengineering 36(3), pp. 310-315, 1990.

[55]: Tao W and Svetlana Z.

Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by improved first derivative UV method. Carbohydrate polymers 73, pp. 248-253, 2008.

[56] : Jiang X, Chen L and Zhong W.

A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. Carbohydrate Polymers 54, pp. 457-463, 2003.

[57]: Krisana S, Sarintorn L, Werasak U and Suwalee C

The relation ship between crystallinity and degree of acetylation of chitin from crab shell. Journal of metals, materials and minerals. Vol 9, N°1, pp. 33-40, 1999.

[58]: Peter M.G.

Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. J.M.S.-Pure Appl. Chem. A32, pp. 629-640, 1995.

[59]: Berger J, Reist M, Mayer J.M, Felt O, Peppas N.A and Gurny R.

Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 57 (1), pp. 19-34, 2004a.

[60]: Berger J, Reist M, Mayer J.M, Felt O and Gurny R.

Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 57 (1), pp. 35-52, 2004b.

[61]: Bodmier R and Chen H.

Preparation and characterization of microspheres containing the anti-inflammatory agents, indomethacin, ibuprofen and ketoprofen. Journal of Controlled Release 10 (2), pp. 167-175, 1989.

[62]: Janes K.A, Fresneau M.P, Marazuela A, Fabra A and Alonso M.J.

Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *Journal of Controlled Release* 73 (2-3), pp. 255-267, 2001.

[63]: Aranaz I, Mengíbar M, Harris R, Paños I, Miralles B, Acosta, N, Galed G and Heras A.

Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology* 3, pp. 203-230, 2009.

[64]: Min Huang, Eugene Khor, and Lee-Yong Lim.

Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharmaceutical Research* Vol 21, N°2, 2004.

[65]: Helander I.M, Nurmiäho-Lassila E.-L, Ahvenainen R, Rhoades J and S. Roller.

Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microb* 71, pp. 235-244, 2001.

[66]: Tsai G.-J and Su W.-H.

Antimicrobial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J. Food Protect* 62, pp.239-243. 1999.

[67]: Fang N, Chan V, Mao H.Q and Leong K.W.

Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. *Biomacromol* 2, pp. 1161-1168, 2001.

[68]: Gupta KC and Jabrail FH.

Effects of degree of deacetylation and crosslinking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydr Polym* 66, pp. 43-54, 2006.

[69]: Zhang H, Oh M, Allen C and Kumacheva E.

Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery *Biomacromolecule* 5(6), pp. 2461-2468, 2004.

[70]: Desai KG and Park HJ.

Effect of manufacturing parameters on the characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres prepared by spray-drying. *Journal Microencapsulation* 23(1), pp. 79-90, 2006.

[71] : Le Hir A.

Pharmacie galénique. *Bonnes pratiques de fabrication des médicaments*. Elsevier Masson S.A.S, pp. 350-354, 2006.

[72] : Gaudy C et Buxeraud J.

Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. *Collection Pharma*, pp. 113-120, 2005.

[73] : Ezaitouni F, Rhou H, Benamar L, Ouzeddoun N, Bayahya R et Balafrej L.

Rein et Aminosités. *Médecine du Maghreb*, 1999.

[74] : Roche/Hitachi.

Tobramycin. *Cobas* vol 7, 2009.

[75] : Partenaires Pharmaceutiques du Canada INC (PPC). Revue, 2009.

[76]: Michael Oduor-Odote P, Marcin H. S and Martin G. P.

Characterisation of Chitosan from Blowfly Larvae and Some Crustacean Species from Kenyan Marine Waters Prepared Under Different Conditions. Western Indian Ocean J. Mar. Sci. Vol. 4, No. 1, pp. 99–107, 2005.

[77]: Entsar S. Abdou, Khaled S.A. Nagy and Maher Z. Elsabee.

Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. Bioresource Technology 99, pp. 1359-1367, 2008.

[78]: Galed G, Miralles B, Panos I, Santiago A and ngeles Heras A.

N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin. Carbohydrate Polymers 62, pp. 316-320, 2005.

[79] : Harish Prashanth K. V, Kittur F. S and Tharanathan R. N.

Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. Carbohydrate Polymers 50, pp. 27-33, 2002.

[80] : Burke A, Yilmaz E and Hasirci N.

Evaluation of chitosan as a potential medical Iron (III) ion absorbent. Turk J Med Sci 30, pp. 341-348, 2000.

[81] : Mohy Eldin M.S, Soliman E.A, Hashem A.I and Tamer T.M.

Antibacterial Activity of Chitosan Chemically Modified with New Technique. Trends Biomater. Artif. Organs Vol 22(3), pp. 121-133, 2008.

[82]: Calvo P, Remuñan-Lopez C, Vila-Jato J.L and Alonso M.J.

Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. J. Appl. Polym. Sci. 63, pp. 125–132, 1997.

[83] : Rouquerol F, Luciani L, Llewellyn P, Denoyel R et Rouquerol J.

« Texture des matériaux pulvérulents ou poreux », Technique de l'Ingénieur P1050.

[84] : Nguyen P.

« Optimisation du catalyseur supporté sur β -SIC pour la réaction d'oxydation directe de l'H₂S en soufre élémentaire, du laboratoire à l'industrie». Thèse doctorat, Université de Louis Pasteur Strasbourg I (2006).

[85] : Silverstein R.M, Basler G.C et Morill T.C.

Identification spectrométrique de composés organiques. Edition De Boeck Université, 1^{ère} édition. 2003.

[86]: Focher B, Beltrame L. P, Naggi A and Torri G.

Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications. Carbohydrate Polymers 12, pp. 405-418, 1990.

[87] : Pillai C.K.S, Willi P and Chandra P. Sharma

Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. Progress in Polymer Science 34, pp. 641–678, 2009.

[88] : Nugraha Edhi SUYATMA.

Développement de films biodégradables à base de chitosane: études du Mélange hitosane/PLA, de la Plastification et de la Compatibilisation. Thèse doctorat en Chimie des Matériaux. Université de Reims-Champagne Ardenne. 2006.

[89]: Soussy C.J.

Comite de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2009.

[90]: Wang G.H.

Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. Journal of Food Protection 55, pp. 916-919, 1992.

[91]: Chang D.S, Cho H.R, Goo H.Y and Choe W.K.

A development of food preservation with the waste of crab processing. Bull. Korean Fish Soc 22, pp. 70-78, 1989.

[92] : Qin C, Li H, Xiao Q, Liu Y, Zhu J and Du Y.

Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. Carbohydrate Polymers 63, pp. 367–374, 2006.

[93] : Kim S.K and Rajapakse N.

Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. Carbohydrate Polymers 62, pp. 357–368, 2005.

[94]: Beaulieu C.

Les effets multiples du chitosane. Phytothérapie, 2007.

[95]: Meziti C.

Régénération et réutilisation d'un déchet provenant de la raffinerie d'huile. Mémoire présentée à la faculté de la technologie de l'université A/M de Bejaia en vue d'obtention du grade de magistère en Génie Chimique. 2009.

[96] : Wu Y, Yang W, Wang C, Hu J and Fu S.

Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. International Journal of Pharmaceutics 295, pp. 235–245, 2005.

[97]: Caliceti P, Salmaso S, Elvassore N and Bertuccio A.

Effective protein release from PEG/PLA nano-particles produced by compressed gas anti-solvent precipitation techniques. Journal of Controlled Release 94, pp. 195– 205, 2004.

[98] : Gombotz W.R and Pettit D.K.

Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery. Bioconjugate Chemistry 6, pp. 332-351, 1995.

[99]: Chien-Chi L and Andrew T. M.

Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. Advanced Drug Delivery Reviews 58, pp 1379–1408, 2006.

[100]: Grassi M and Grassi G.

Mathematical modelling and controlled drug delivery: Matrix systems. *Current Drug Delivery* 2, pp. 97-116, 2005.

ANNEXE

Annexe

Déplacement des transitions thermiques

Chaque polymère est caractérisé par une température de transition vitreuse propre (T_g). Lorsqu'un mélange de deux polymères est caractérisé par deux transitions vitreuses distinctes, identiques à celle des polymères parents, cela indique l'incompatibilité entre les deux polymères. A l'inverse, un mélange de polymères compatibles présenterait une transition vitreuse unique peu étalée en température. L'analyse enthalpique différentielle (AED) et l'analyse thermomécanique dynamique (ATMD) sont les techniques couramment utilisées pour observer l'évolution de la T_g des mélanges en fonction de la composition.

Pour les polymères miscibles, il existe des modèles qui permettent de prédire l'évolution de la T_g du mélange en fonction de sa composition. Une approche très simple est l'équation de Gordon-Taylor (1952):

$$T_g = \frac{w_1 T_{g1} + K w_2 T_{g2}}{w_1 + K w_2}$$

Où w_i et K sont respectivement la fraction massique du polymère i et une constante empirique. Cette équation, applicable à un mélange binaire, sert à modéliser l'effet d'un plastifiant sur les polymères.

L'équation de Fox, encore plus simple, introduite par Gordon (1977) est fondée sur une approche empirique de l'évolution de la T_g du mélange, soit :

$$\frac{1}{T_g} = \frac{w_1}{T_{g1}} + \frac{w_2}{T_{g2}}$$

Ainsi la détermination expérimentale de la T_g d'un mélange de polymères et la comparaison avec le modèle Gordon-Taylor permet d'évaluer leur compatibilité. L'abaissement de la température de fusion (T_f) d'un des constituants peut également être le signe d'une certaine compatibilité entre les polymères du mélange et donc servir de critère de compatibilité. Toutefois, la fiabilité de ce critère est souvent mise en question car des modifications de morphologie des constituants après mélange peuvent également provoquer l'abaissement du point de fusion. Il peut y avoir compétition entre les effets thermodynamiques (dont dépend la compatibilité) et certains effets morphologiques.

Résumé

Ce travail avait pour objectif l'extraction de la chitine à partir des carapaces des crevettes puis sa transformation par voie chimique en chitosane. Ce dernier est utilisé dans l'élaboration des formulations à effet retard, d'un principe actif 'tobramycine' qui rentre dans les formes médicamenteuses à voie oculaire. L'étude de la cinétique de libération du principe actif a montré que celle-ci suit un mécanisme limité par un processus de diffusion.

La masse molaire et le degré de désacétylation du chitosane ont été déterminés par les méthodes viscosimétrique et potentiométrique, qui sont estimés à 27,95kDa et 88,72% respectivement, par comparaison avec un chitosane commercial utilisé comme témoin, de masse moléculaire 74,578kDa et caractérisé par un degré de désacétylation de 64,12%.

Les caractérisations des deux polymères et du principe actif par IRTF, ATG/DTG, MEB et DRX ont abouti à un ensemble de résultats. Le chitosane synthétisé et commercial ainsi que la tobramycine présentent des structures chimiques, des effets thermiques, et des morphologies distinctes.

L'étude antibactérienne du chitosane (CH) et du chitosane associé à la tobramycine, vis-à-vis des germes de *Staphylocoque aureus* (S220) au moyen de la technique des puits à différentes concentrations ; 0.5, 1 et 1.5% du polymère préparé dans l'acide acétique à 1% et pour deux valeurs de pH, 5.8 et 6.2, a confirmé l'amélioration de l'activité à pH= 5,8 et pour de faibles concentrations.

L'étude de la cinétique de libération de la tobramycine à travers la matrice polymérique précédente *in vitro*, révèle que le taux d'encapsulation est plus important avec la diminution de la concentration et le pH des solutions du chitosane et avec l'augmentation de son poids moléculaire. Par conséquent, la libération contrôlée est dominé par un profil de type non fickien à pH=5 tandis que le profil de libération obéit plutôt à la loi de fick à pH=6.

Mots clés : Chitosane, Libération prolongée, Gélification, Tobramycine, Biodégradation.

Summary

This work aimed at the extraction of chitin from shrimp shells then at its transformation into chitosan chemically. The latter is used in the preparation of delayed effect formulations, of an active ingredient 'tobramycin' which contributes to the making of ocular route drug forms.

The molecular weight and degree of deacetylation of chitosan were determined by viscometric and potentiometric methods, which are estimated to 27.95 kDa and 88.72% respectively, compared with a commercial chitosan used as a control, molecular weight 74.578 kDa, characterized by a degree of deacetylation of 64.12%.

The characterizations of both polymers and the active principle by FTIR, TGA / DTG, SEM and XRD have led to a set of results. The chitosan synthesized and commercial and tobramycin have chemical structures, thermal effects, and distinct morphologies.

The study of antibacterial chitosan (CH) and chitosan combined with tobramycin, vis-à-vis the seeds of *Staphylococcus aureus* (S220) using the technique of wells at different concentrations, 0.5, and 1.5% of a polymer prepared in 1% acetic acid and two pH values, 5.8 and 6.2, has confirmed the improvement in activity at pH 5.8 and at low concentrations.

The study of the release kinetics of tobramycin through the previous polymer matrix *in vitro* showed that the rate of encapsulation is more important with decreasing concentration and the pH of chitosan solutions and with its increased molecular weight. Therefore, the controlled release is dominated by non-Fickian type at pH=5 while the release profile obeys the law of fick at pH = 6 instead.

Keywords: Chitosan, Prolonged liberation, Gelification, Tobramycin, Biodegradation.