

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**UNIVERSITÉ de BLIDA 1**

**Faculté de Technologie**

**Département de Génie des Procédés**



# **Mémoire**

En vue de l'obtention du diplôme de

**MASTER GENIE PROCEDES**

**Spécialité : pharmacie industrielle**

Intitulé du mémoire

## **Formulation d'une crème 100 % bio à base du chitosane**

Présenté par:

M<sup>elle</sup>: Adim Hassina

M<sup>elle</sup>: Belkhier Zineb

Encadré par :

M<sup>eme</sup>: Larribi Hasiba

M<sup>eme</sup>: Bani Safia

Université de Blida

Juin 2016



## **DEDICACE**

A mes très chers parents,

Auxquels je dois ce que je suis.

A mes chères sœurs et mes frères

Pour leur amour et leur incontestable appui

A toute ma famille.

A mes chéries Nassima et Hanane

Pour tous les instants inoubliables que j'ai passés avec vous, je vous aime

beaucoup.

A mon binôme Zineb et sa famille.

A tous mes chères amis (es) : Imane, sara

Mohamed, Lotfi, Amel, Chahra .... Et la liste est bien longue.

Je dédie ce travail à toutes les personnes chères à mon cœur. Qu'elles trouvent

ici l'expression de toute ma gratitude et mon amour.

Hassina

## **DEDICACE**

Je dédie ce modeste travail à :

Mon grand-père, mon père et ma mère qui me sont très chers, je leurs  
Souhaite une longue et heureuse vie pleine de santé.

Mes chères frère : Fatah et Imade que j'aime beaucoup et je lui souhaite la  
réussite.

A mon binôme Hassina et sa famille.

Mes cousines: Soulef, Nadia, Zhor et mes amis (es).

Tout le master pharmacie industrielle

Et à toute personne me connait

Zineb

## **REMERCIEMENTS**

On remercie tout d'abord Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté, la santé et la patience de mener à terme ce présent travail.

Nos remerciements vont spécialement à mon encadreur, Dr LARIBI. H et aussi mon Co-encadreur Dr. DJEDRI-BANI leurs précieux conseils et leurs aide durant toute la période de nos projet de fin d'étude.

Nos remerciements vont également à Dr. ZEDEME. Chafia du département de Génie procédé de l'université de Blida-1 pour ses bonnes explications qu'ils ont éclairé le chemin de la recherche, Madame Lynda Belhadji ingénieur en chimie pour son aide précieux.

On tient à remercier également les membres de jurys de l'université de Blida-1 pour avoir accepté d'examiner ce mémoire et faire partie du jury de soutenance.

Enfin, nous adresse nos remerciements, à toutes les personnes qui nous ont encouragé et soutenu de près ou de loin durant la réalisation de ce travail.

**Hassina & Zineb**



## المخلص

البوليمار الذي كان موضوع دراستنا هو الشيتوزان الذي تم استخراجة من بقايا الجمبري الاحمر الوجود في المناطق الجزائرية . استخراج هذا الاخير يمر بأربعة مراحل هي التخلص من المعادن, التخلص من البروتينات, التبييض, و اخيرا التخلص من مجموعة الاستيل.

و قد تم تمييز المنتج بواسطة تحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء, حيود الأشعة السينية, المجهر الالكتروني الماسح. الكريم العلاجي الطبيعي المتحصل عليه يملك عدة خصائص علاجية مضاد للجراثيم مضاد للفطريات معالج للندبات. تمدنا لاستخدامات جلدية و تفتح الممر الى أبحاث جدّ مقدرة بالنجاح.

الفرق بين الكريمات العلاجية التقليدية و الطبيعية هو المصدر, العدد و نسبة المواد الأولية الكريمات العلاجية التقليدية تستعمل مواد أولية جدّ مضرّة لصحة الانسان التي في بعض الحالات تصل الى إحداث امراض و اثار جانبية. بإمكان الكريمات العلاجية الطبيعية أن تكون حلاً بديلاً.

في دراستنا قمنا بصنع مزيج يشكّل كريم علاجي طبيعيّ عنصره الفعّال هو الشيتوزان. بتحسين معايير المزج تمكنا من صنع كريم مستقر. عن طريق التحليل الفيزيوكيميائية, الحسية و دراسة مقارنة مع كريم مرج (زيتنا, ميكوستر, مديكاسول), استطعنا اثبات نقاط القوة للكريم الطبيعية التي صنعناها.

**كلمات البحث:** البوليمر، الشيتوزان، وصياغة، وتضميد الجراح، فطريات، مضاد للجراثيم، كريم الحيوي

## RESUME

Le biopolymère qui a fait l'objet de notre étude est le chitosane qui est extrait à partir des carapaces de crouvette rouge de l'Algérie. L'extraction de ce dernier est passée par quatre étapes : déminéralisation, déprotéinisation, décoloration, et à la fin la désacétylation.

Le produit obtenu a été caractérisé par : spectroscopie infrarouge (FTIR). Diffraction rayon X (DRX), la microscopie électronique à balayage (MEB).....etc.

La crème thérapeutique BIO obtenue possède des propriétés cicatrisante, antibactérienne, et antifongique. Elle conduit à des utilisations dermatologiques et ouvre la voie à des recherches qui seraient éventuellement fécondes.

La différence entre les crèmes thérapeutiques conventionnelles et biologiques c'est la source, le nombre et le pourcentage de leurs matières premières. Les crèmes thérapeutiques conventionnelles sont très nocives à la santé humaine qui peuvent causer même des maladies et des effets secondaires, les crèmes thérapeutiques d'origine biologiques peuvent être présentés comme la solution alternative à ce problème.

Durant notre travail nous avons formulés une crème thérapeutique bio, en optimisant les paramètres de formulation (physicochimique et sensorielle), l'étude comparative avec des crèmes de références (Mycoster , Zeta ,Madécassol) ce qui nous a permis de qualifier de notre crème bio comme étant un produit de qualité.

**Mots clé :** biopolymère, chitosane, formulation, cicatrisante, antifongique, antibactérienne, crème bio

## ABSTRACT

The biopolymer, which has been the object of our study, is the chitosan which is extracted from the shells of red shrimp of Algeria. The extraction of this last is increased by four steps: demineralization, deproteinization, discoloration, and at the end the deacetylation.

The product obtained has been characterized by: Infrared Spectroscopy (FTIR). Radius diffraction X (XRD), scanning electron microscopy (SEM).....etc.

The Therapeutic cream Bio obtained has properties wound healing, antibacterial, and antifungal. It leads to the dermatological uses and opens the way for research which would eventually be fruitful.

The difference between the conventional therapeutic creams and biological is the source, the number and the percentage of their raw materials. The conventional therapeutic creams are very harmful to human health that can cause even problems and secondary effects. The Therapeutic biological creams can be presented as the alternative solution to this problem.

During our work we have formulated a therapeutic cream Bio, we have optimizing the parameters of formulation (physicochemical and sensory); the comparative study with references creams (Mycoster, Zeta, Madécassol) Which allows us to qualify our bio cream as a quality product.

**Keywords:** chitosan, formulation, healing, antifungal, antibacterial, bio cream

## TABLE DES MATIERES

RESUME

DEDICACE

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION ..... 1

### CHAPITRE I: LA CHITINE ET LE CHITOSANE

I.1 Contexte économique ..... 2

I.2 Le chitosane et la chitine ..... 3

1. Historique ..... 4

I.2.1 La chitine ..... 4

1. Définition ..... 4

2. Source de la chitine ..... 5

I.2.2 Le chitosane ..... 5

1. Définition: ..... 5

2. Source de chitosane ..... 6

3. Préparation du chitosane ..... 6

4. Propriétés physico-chimiques du chitosane ..... 9

5. Comportement du chitosane en milieu acide ..... 11

6. Propriétés de biocompatibilité du chitosane ..... 11

7. Propriétés biologiques ..... 12

8.Principales applications du chitosane dans le Domaine biomédical et pharmaceutique .....	16
--	----

## CHAPITRE II: LA PEAU ET LA CICATRISATION

II.1 la peau et la cicatrisation .....	18
II.1.1. Introduction .....	18
II.1.2. Anatomie de la peau .....	18
II.1.3. Physiologie de la peau humaine .....	19
II.1.4. Les plaies et cicatrisation cutanée .....	20
II.1.4.1. Les trois types de plaies .....	20
II.1.4.2. Phénomènes de cicatrisation de la peau .....	21
II.2. Généralité sur les produits parapharmaceutique .....	22
II.2.1. Définition d'un produit pharmaceutique .....	22
II.2.2. Généralité sur les produits pharmaceutique .....	22
II.2.3. Les émulsions .....	23
II.2.3.1. Les différents types d'émulsions .....	23
II.2.3.2. La Stabilité des émulsions .....	24
II.2.3.3. Les émulsions topiques .....	25
II.2.3.4. Mécanismes d'absorption à travers la peau .....	26

## CHAPITRE III: PARTIE EXPERIMENTALE

III.1.1 Matériels .....	27
III.1.2 Méthodes .....	29
III.1.2.1. Extraction de la chitine .....	29
III.1.2.2. Préparation du chitosane .....	30
III.1.2.3. Caractérisations physico-chimique du chitosane .....	30
III.1.2.4. Formulation de la crème bio .....	35
III.1.2.5. Caractérisation de la crème .....	35

III.2.1 Résultats d'extraction de chitosane .....	38
III.2.1.1 Extraction de chitine et production de chitosane. ....	38
III.2.1.2 Caractérisation physico chimique de chitosane .....	38
III.2.2 Formulation et caractérisation de la crème bio .....	47
III.2.2.1 Formulation de la crème bio .....	47
III.2.2.2 Caractérisation de la crème bio .....	53
CONCLUSION .....	63

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

## TABLE DES FIGURES

Figure I.1 : Ventes de chitine en fonction des zones géographiques. ....	3
Figure I.2: Structure chimique de la chitine . ....	4
Figure I.3 : Structure chimique du chitosane. ....	6
Figure I.4: procédé de la fabrication de chitine et chitosane. ....	7
Figure I.5: structures du chitosane en milieu acide (A) et en milieu neutre (B) .....	11
Figure II.1 : Classification des plaies en fonction de leur profondeur. ....	21
Figure III.1: Rhéomètre Anton Paar Modular Compact Rheometer MCR 302. ....	37
Figure III.3 : Courbe du dosage potentiométrique du chitosane extrait. ....	40
Figure I11.4: dérivée seconde du dosage potentiométrique du chitosane extrait .....	41
Figure I11.5: diffractogramme de chitosane commerciale et extrait .....	42
Figure III.6 : image par microscope électronique à balayage du chitosane commerciale à différent dimensions : 100 $\mu\text{m}$ , 50 $\mu\text{m}$ , 20 $\mu\text{m}$ .....	43
Figure III.7 : image par microscope électronique à balayage du chitosane commerciale à différent dimensions : 100 $\mu\text{m}$ , 50 $\mu\text{m}$ , 20 $\mu\text{m}$ .....	43
Figure III.8: rhéogramme des courbes d'écoulement des différentes crèmes formulés. ...	56
Figure III.9: Courbes d'écoulement de la crème de référence et de l'optimum. ....	61
Figure III.10: Image microscopique montrant une émulsion H/E des 2 crèmes (Optimum « crème thérapeutique BIO » et référence) avec un agrandissement 100 x. ....	62

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 : Source de la chitine Teneur % . . . . .	5
Tableau I.2 : corrélation entre les valeurs DDA et la solubilité du chitosane à pH 6 . . . . .	10
Tableau I.3: Les hypothèses d'action antibactérienne de chitosane. . . . .	13
Tableau I.4: applications du chitosane dans les domaines biomédical et pharmaceutique	17
Tableau III.1 : Résultat des caractéristiques de chitosane. . . . .	38
Tableau III.2 : Résultat de test de solubilité du chitosane extrait et commerciale . . . . .	39
Tableau III.3 : Résultat du test de solubilité du chitosane extrait et commerciale à différente concentration d'acide acétique. . . . .	39
Tableau III.4 : l'activité microbiologique du chitosane à 1 % . . . . .	44
Tableau III.5 : l'activité microbiologique du chitosane à 1.5 % . . . . .	44
Tableau III.6: l'activité microbiologique du chitosane à 2 % . . . . .	45
Tableau III.7 : Proportions et résultats de formulations de la crème $\phi_H / \phi_A = 75/25$ . . . . .	48
Tableau III.8: Proportions et résultats de formulations de la crème $\phi_H / \phi_A = 70/30$ . . . . .	48
Tableau III.9 : Proportions et résultats de formulations de la crème avec différente concentration de tensioactif. . . . .	49
Tableau III.10: Proportions et résultats de formulations de la crème $\phi_H / \phi_A = 55/45$ . . . . .	50
Tableau III.11 : Proportions et résultats de formulations de la crème $\phi_H / \phi_A = 50/50$ . . . . .	50
Tableau III.12: Les formulations représentant les crèmes stable. . . . .	51
Tableau III.13 : Proportions et résultats de formulation de la crème 50/50 avec différentes concentrations de chitosane 0.25% - 1%. . . . .	52

Tableau III.14 : Proportions et résultats de formulation de la crème 55/45 avec différentes concentrations de chitosane 0.25% - 1%. .....	52
Tableau III.15: les Résultats de test de stabilité par température des différentes crèmes formulés .....	53
Tableau III.16 : Résultats de mesure du pH des différentes crèmes formulés .....	54
Tableau III.17: les Formulations représente les crèmes les plus stable avec meilleure pH .....	55
Tableau III.18 : Résultats de la viscosité et des coefficients de corrélation des crèmes obtenus par le rhéomètre. ....	58
Tableau III.19: Moyenne des critères de l'analyse sensorielle des crèmes stables. ....	60

## INTRODUCTION

La formulation est une activité technologique. Son objectif est la conception et la mise au point de produits artisanaux ou industriels. De nos jours la formulation est devenue l'une des branches les plus importantes grâce au développement et l'innovation qui ne cessent d'accroître, elle consiste à mélanger différents composants afin d'en arriver à une formule permettant d'avoir un produit stable, non toxique et homogène, elle concerne non seulement le domaine pharmaceutiques et parapharmaceutiques mais aussi le domaine cosmétique et l'agro-alimentaires, etc.

Aujourd'hui, Existants et disponibles sur les marchés des produit pharmaceutiques et parapharmaceutiques à base de matière première synthétique nocive pour la santé humaine et aussi sur l'environnement. Sur cette base la recherche de produits bio est devenue un souci majeur dans le domaine de la recherche scientifique.

Comme nous savons que la formulation comprend généralement un ou plusieurs composés actifs ou de base, des charges et des additifs (colorants, parfums, solvants, plastifiants, stabilisants, etc.). Pour cela nous allons faire mélanger différents matières premières naturelle à des proportions bien déterminé permettant de formuler une crème BIO conforme, respectant les exigences et répondant aux besoins des consommateurs.

Ce travail a permet la formulation une crème bio à base d'un principe actif extrait à partir de carapace de crevette (chitosane). Le chitosane est un biopolymère naturel, non toxique, biodégradable, et biocompatible, c'est aussi un polymère très actif et versatile.

Une optimisation des paramètres de formulation à savoir le rapport des phases et les pourcentages du mélange de la phase organique a été effectuée. Des tests de stabilité par centrifugation, détermination du pH, viscosité, l'examen de l'état structural par microscopie optique, ainsi que l'analyse sensorielle (organoleptique) ont fait l'objet d'une caractérisation des formulations optimisées.

A la fin nous avons comparé les crèmes formulées avec quelques crèmes de références cela nous a permis de sélectionner la formulation qui se rapproche le plus d'une de ces crèmes de référence. Aussi l'étude sensorielle qui est une analyse très importante liées directement au consommateur a été le meilleur critère afin de sélectionner la formulation la plus intéressante.

## **I.1 Contexte économique :**

### **I.1.1. Évolution du marché des produits marins, focus sur les crustacés dans le monde :**

Le marché des produits aquatiques ne cesse d'augmenter à l'échelle internationale. La forte hausse de la demande est principalement liée à l'augmentation de la consommation humaine. Elle représentait 0,7 Kg par habitant en 1970 tandis qu'elle a atteint 7,8 Kg par habitant en 2008, soit une augmentation de 6,6% par an [1].

La consommation humaine de produits marins a atteint 72,1 Mt en 2006. Son augmentation suit celle de la population.

Avant la crise de 2009, l'augmentation de la consommation était particulièrement marquée pour les crustacés, principalement la crevette. La consommation mondiale est passée de 0,4 kg/hab en 1961 à 1,6 kg/hab en 2005. Aujourd'hui, la crevette est la première valeur échangée parmi les produits marins. Sa production annuelle mondiale était estimée à plus de 6 Mt en 2005. La région Asie-Pacifique, et notamment la Chine, la Thaïlande, le Vietnam, l'Indonésie et l'Inde, est la principale productrice, totalisant près de 88 % des productions [2-3].

Les exportations de crevettes atteignent 14 milliards de dollars par an, soit 16 % des produits marins. La part de l'aquaculture représente 70 % de la production mondiale de crevettes et plus généralement 76 % pour l'ensemble des crustacés.

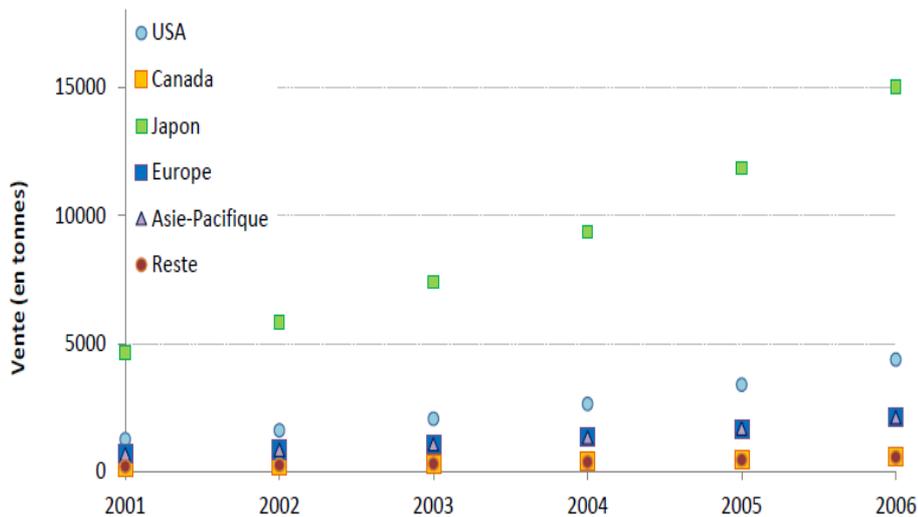
L'une des espèces de crevette les plus commercialisées est la crevette tropicale, dite crevette à patte blanches, « *Penaeus vannamei* ». À l'origine, elle était cultivée uniquement sur la côte Pacifique de l'Amérique latine. Depuis sa production s'est étendue. Elle a atteint 67 % de la production mondiale en 2008. La consommation de *P. vannamei* est très prisée. Elle a augmenté de 58 % en Asie et de 21.1 % en Amérique latine entre 2001 et 2006.

### **I.1.2 Valorisation des coproduits de crustacés : la production de chitine**

Les coproduits de crustacés représentent plus de 60 % du poids frais [4]. Ce volume constitue une ressource abondante de chitine. Ce polysaccharide ancien constitue l'exosquelette des crustacés.

La production de chitine se situe en majorité en Asie-Pacifique. Les coproduits de crustacés y sont disponibles et la législation liée au retraitement des effluents est peu contraignante. En 2004, on répertoriait 63 producteurs de chitine ayant une place importante sur le marché, dont la moitié en Asie Le Japon est le premier producteur [5].

Pour la plupart des applications, la chitine n'est pas utilisée directement. Elle est convertie, principalement en chitosane et chitooligosaccharides. La production de chitine était de l'ordre de 25 000 tonnes en 2006, dont près de 8 000 tonnes pour sa conversion en chitosan [6]. En 2000, 10 000 tonnes de chitine étaient produites [7], dont près de 6 667 T pour la fabrication de glucosamine, 2 667 T pour le chitosan et 1 000 T pour les oligosaccharides. Le marché de la chitine n'a cessé de croître comme en témoigne la figure (I.1). Les ventes de chitine ont atteint près de 25 000 tonnes en 2006.



**Figure I.1 :** Ventes de chitine en fonction des zones géographiques. [6]

D'après la figure (I.1), le Japon domine nettement le marché de la chitine. Il participe à 61 % des ventes mondiales. Les perspectives annoncées à l'horizon 2015 maintiennent globalement ces écarts entre les régions. La production de chitine atteindrait près de 63 000 tonnes.

## **I.2 Le chitosane et la chitine :**

Le chitosane est un biopolymère de source principalement marine. En général, les biopolymères sont une classe de polymères produits par les organismes vivants : végétaux, animaux et microorganismes. Ce sont des macromolécules biologiques biodégradables renouvelables qui sont formées par la polymérisation de molécules plus simples ou monomères reliés entre eux par des liaisons dites « covalentes ». Les polysaccharides (Celluloses et dérivés, amidons et dérivés, chitine et chitosane, etc.), les protéines (gélatine, gluten, etc.), les composés lipidiques (cires, acides gras et dérivés, etc.), l'ADN et l'ARN

sont tous des exemples de biopolymères, dans lesquels les unités monomères, respectivement, sont des sucres, des acides aminés, des acides gras ou des acides nucléiques [8].

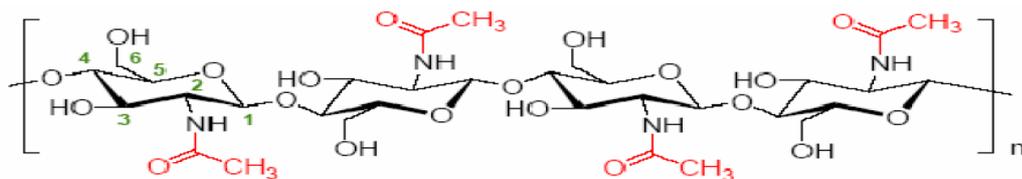
### I.2.1 Historique :

En 1811, le Pr. Henri Braconnot, Directeur du jardin biologique à Nancy (France) a isolé une substance fibreuse d'un certain type de champignon, qu'il a appelée "fongine". De plus, il a observé que cette substance n'est pas soluble dans les solutions aqueuses 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 « enveloppe ». En 1859, le Pr. C. Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin a observé les différentes solubilités de la chitine. La substance, résultat du traitement alcalin, a pu être dissoute dans les acides. Cependant, c'est seulement en 1894 que cette substance a été nommée chitosane par Hoppe-Seyler. La production du chitosane a débuté en 1920, mais sa structure chimique n'a été identifiée que 50 ans plus tard grâce à la cristallographie et la spectroscopie infrarouge [9].

### I.2.2 La chitine :

#### 1. Définition :

La chitine est un polysaccharide linéaire formé d'unités de N-acétyl-D-glucosamine reliés entre eux par une liaison du type  $\beta$ -(1-4). D'une manière intéressante, la formule chimique de la cellulose est très proche de celle de la chitine où le groupement hydroxyle (C<sub>2</sub>) a été remplacé par les groupements d'acétamide. En fait, Roberts associe cette similarité entre la molécule de la chitine et celle de la cellulose à une fonction similaire de structure (figure I.2).



**Figure I.2:** Structure chimique de la chitine [10].

## **2. Source de la chitine :**

La chitine est le deuxième composant très abondant dans la nature après la cellulose, elle n'existe que sous la forme de complexe avec des protéines et des minéraux. Ce biopolymère est présente principalement dans l'exosquelette des arthropodes (crustacés), l'endosquelette des céphalopodes (calamars) et les cuticules des insectes.

La chitine se trouve dans la paroi de la plupart des champignons et de certaines algues chlorophycées, levures et bactéries [11]. Bien que les sources potentielles de chitine soient très nombreuses (tableau I.1), elle est essentiellement produite aujourd'hui à partir des carapaces de crevettes. Pendant longtemps, ces déchets n'étaient pas récupérés et étaient simplement rejetés à la mer après décorticage.

Les carapaces de crustacés contiennent environ 30-40% de protéine, 30-50% de carbonate de calcium, et 20-30% de chitine par rapport au poids sec [12].

Tableau I.1 : **Source de la chitine Teneur %.**

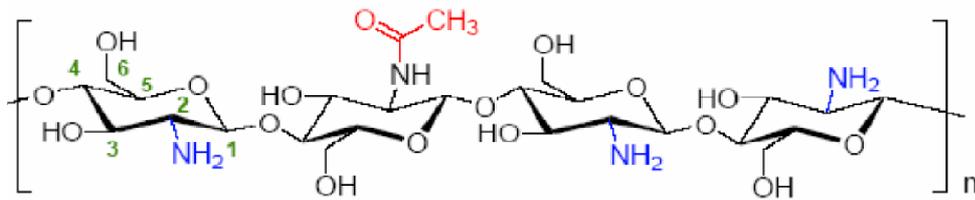
Source de la chitine	Teneur en %
<i>Bernacle (Lepas anatifera)</i>	7
<i>Crabe marbré (Grapsus marmoratus)</i>	10
<i>Crabe araignée (Maia squinado)</i>	16
<i>Homard (Homarus vulgaris)</i>	17
<i>Langouste (Palinurus vulgaris)</i>	32
<i>Ecrevisse (Astacus fluviatilis)</i>	36
<i>Crevette (Palaemon fabricius)</i>	22
<i>Seiche (Sepia officinalis)</i>	20
<i>Calamar (loligo vulgari)</i>	40

### **I.2.3 Le chitosane :**

#### **1. Définition:**

Le chitosane est un polysaccharide de structure linéaire. C'est un biopolymère cationique de glucosamine partiellement acétylé [13]. Le terme chitosane, loin de répondre à une seule et unique structure chimique bien définie, s'adresse à toute une famille de copolymères linéaires à arrangement aléatoire d'unités N-acétyle-D-glucosamine et de D-glucosamine en

proportions variables [10], et liées entre elles par des liaisons  $\beta$ -(1-4) (figure I.3) qui confèrent au chitosane de bonnes caractéristiques filmogènes [14].



**Figure I.3 :** Structure chimique du chitosane. [15]

Généralement, le chitosane a trois types de groupes fonctionnels réactifs : les groupes amines sur le carbone (C<sub>2</sub>), les groupes hydroxyles primaires et secondaires sur le carbone (C<sub>3</sub>) et le carbone (C<sub>6</sub>). La nature chimique du chitosane fournit beaucoup de possibilités alternatives pour des modifications covalentes et ioniques qui permettent l'ajustement étendu des propriétés mécaniques et biologiques.

## **2. Source de chitosane :**

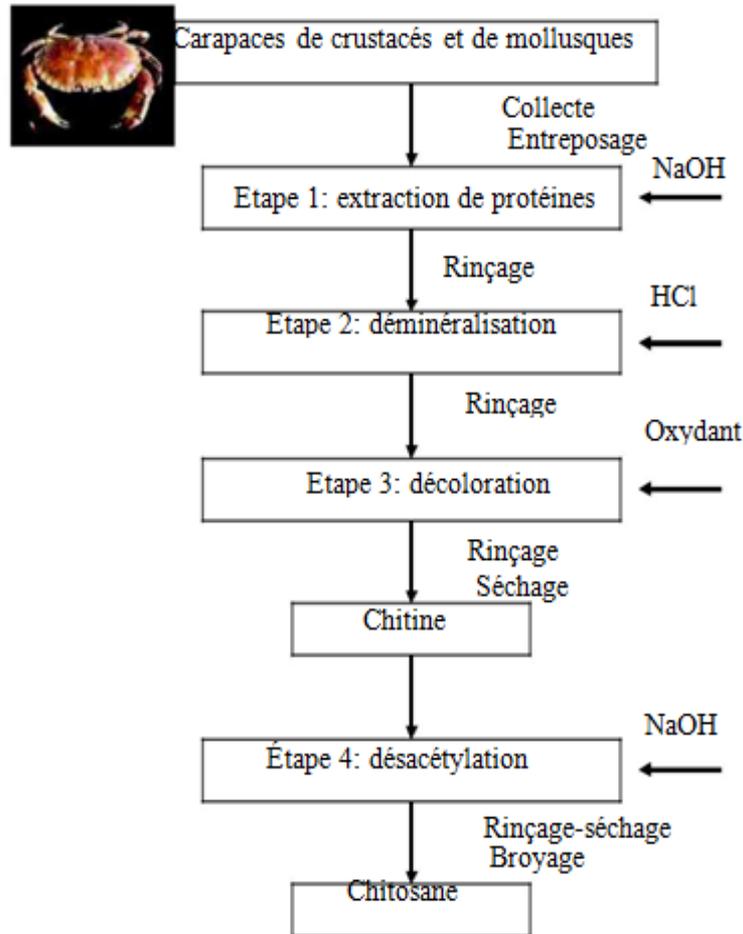
Depuis quelques années, les biotechnologies marines ont suscité un intérêt croissant qui s'est notamment centré sur la chitine et ses dérivés, le chitosane étant le principal. Il s'agit donc d'une source renouvelable de matériau biodégradable. Les récents progrès réalisés dans l'étude de la fabrication du chitosane et de ses propriétés ainsi que la découverte d'un grand nombre d'applications potentielles ont favorisé cet engouement.

Le chitosane est une substance très peu répandue dans la nature [16]. Il est rare et n'est présent que dans les parois cellulaires d'une classe particulière de champignons, les zygomycètes de bactéries et de levures et chez certains insectes, Il n'y a donc pas de source primaire de chitosane exploitable. La source majeure du chitosane vendu commercialement provient de la désacétylation de la chitine obtenue à partir de crustacés. La production de la chitine et du chitosane provient, en effet, des crevettes et des crabes qui représentent les deux sources naturelles les plus abondantes. Ce sont donc des produits d'origine animale.

## **3. Préparation du chitosane :**

Les déchets de l'industrie des crustacés sont une source très importante de chitine et de chitosane. De nombreuses méthodes ont été développées afin de préparer la chitine à partir des exosquelettes. De manière générale, ces méthodes consistent à éliminer les

protéines (déprotéinisation), les éléments minéraux (déminalisation), la couleur (blanchiment) et les groupements d'acétamides (désacétylation). La méthode standard pour préparer la chitine et le chitosane est expliquée dans la Figure (I.4)



**Figure I.4:** procédé de la fabrication de chitine et chitosane. [17]

### **3.1 Préparation des carapaces :**

La matière première est constituée de carapaces de crevettes. La langouste ou le crabe peuvent aussi être utilisés. Dès leur récupération, les carapaces sont lavées et conservées sur la glace (3 °C). Elles sont ensuite séchées dans un flux d'air à 103 °C pendant 20 heures puis broyées de façon à obtenir des particules dont la taille est de l'ordre du millimètre. Plus les carapaces sont finement broyées, plus les réactions ultérieures seront complètes.

### **3.2 Déprotéinisation :**

Les protéines, associées à la chitine, sont extraits par des solutions alcalines diluées à chaud. Cette procédure consiste à faire bouillir les copeaux de carapaces dans une solution



La réaction a lieu sous atmosphère inerte (N<sub>2</sub>) et sous agitation. La quantité de soude à 50 % doit être cinq fois supérieure en poids à la quantité de chitine déterminée par mesure de la matière sèche. Le mélange bouillant est ensuite refroidi à l'eau froide. Le chitosane est collecté par filtration, lavé à l'eau distillée jusqu'à neutralité du mélange. Il est finalement séché dans un flux d'air chaud à 65 °C pendant 16 heures. Le chitosane obtenu présente un degré de désacétylation d'environ 90 % [19].

L'agressivité et le peu de maîtrise de la désacétylation de la chitine par voie chimique ont motivé l'intérêt d'explorer et de développer d'autres alternatives telles que l'utilisation d'enzymes. Il a été possible d'atteindre des degrés de désacétylation (DDA) par voies enzymatiques (en utilisant la chitine désacétylase ou l'acétyl xylane estérase) comparables aux traitements basiques, soit près de 75 % de désacétylation en 28 heures [20]. Cette technique est intéressante mais ne permet pas pour l'instant de développements au niveau industriel. En effet, l'utilisation d'enzymes n'est pas viable car elle représente des quantités et des coûts trop élevés.

#### **4. Propriétés physico-chimiques du chitosane :**

##### **4.1 Degré de désacétylation :**

Le traitement alcalin de la chitine conduit généralement à une désacétylation partielle. Le degré de désacétylation (DDA) du chitosane est extrêmement important car il influence les propriétés des chaînes macromoléculaires des polymères et leur comportement en solution [21] comme la solubilité du chitosane, la flexibilité des chaînes macromoléculaires, la conformation du polymère et par conséquent la viscosité des solutions. De nombreuses méthodes ont été proposées pour déterminer le DDA sur des échantillons solides : la spectroscopie IR [22], l'analyse élémentaire [23], la RMN du solide [24], ou sur des échantillons en solution : dosage UV [25], RMN du liquide [26].

##### **4.2 Masse moléculaire :**

Les chitosanes obtenus industriellement ont une masse molaire (MM) de l'ordre de 100-500 kDa. La détermination de la MM peut se faire par des mesures viscosimétriques, par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à différentes techniques de détection (réfractométrie, microviscosimétrie, diffusion statique de la lumière multi-angle) [27]. Les masses de chitosanes dépendent, en fait, du type d'application désirée.

### 4.3 Cristallinité :

La cristallinité est un paramètre important car elle contrôle un certain nombre de propriétés comme l'accessibilité des sites internes dans les chaînes macromoléculaires, les propriétés de gonflement dans l'eau ou encore les propriétés diffusionnelles [18]. La cristallinité est en général déterminée par des mesures de diffraction de rayons X [10]. En fait, le chitosane est généralement une substance semi-cristalline. Il cristallise dans le système orthorhombique et deux types de produits sont connus : le chitosane I (faible DDA, sous forme de sel) est plus désordonné que le chitosane II (fort DDA, forme amine libre) [7].

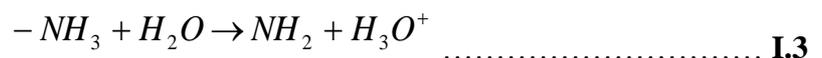
### 4.4 Solubilité :

En général, la solubilité du chitosane dépend de la valeur de DDA, de la force ionique, du pH, de la nature de l'acide utilisé et de la distribution des groupes acétyles le long de la chaîne macromoléculaire [18]. En général, un chitosane avec un DDA supérieur à 70 % est utilisé pour augmenter sa solubilité. Le tableau en dessous présente la corrélation entre les valeurs de DDA et la solubilité du chitosane [28]. De plus, la solubilité du chitosane augmente lorsque la masse molaire diminue [29].

Tableau I.2 : corrélation entre les valeurs DDA et la solubilité du chitosane à pH 6 [28].

DDA (%)	Solubilité du chitosane
> 75	Parfaite
= 50	Moyen
< 40	Faible

Le chitosane est soluble dans les acides dilués grâce à la protonation de ses fonctions amines suivant l'équilibre :



$$K_a = \frac{[-NH_2] \cdot [H_3O^+]}{[-NH_3^+]}$$

Plus le milieu est acide, plus les groupements amines sont protonés, donc cela favorise la solubilité de chitosane. Le chitosane est en effet insoluble dans l'eau et dans les solutions alcalines concentrées ou diluées. Il est également insoluble dans les solvants purs et les

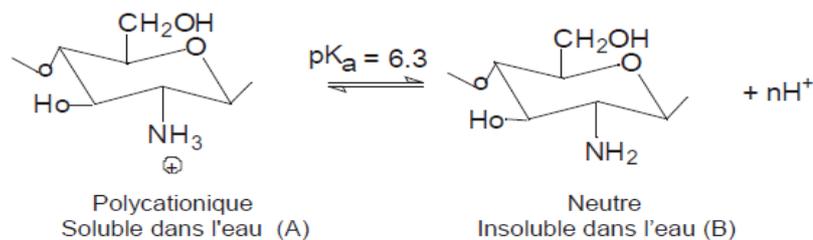
acides concentrés, en raison de l'impossibilité d'hydrater le matériau [7]. L'acide le plus utilisé pour préparer une solution de chitosane est l'acide acétique dilué (0,1-1 %).

#### 4.5 Viscosité :

La viscosité est une caractéristique importante du chitosane concernant son comportement en solution. Cette caractéristique est liée à la conformation des chaînes macromoléculaires en solution. La viscosité dépend, non seulement du DDA, du MM, mais aussi du pH car ces deux paramètres déterminent la densité de charge sur la chaîne de polymère [21]. Plus le pH est bas, plus la viscosité est donc forte. La viscosité augmente également avec le DD car plus le polymère est désacétylé, plus la proportion de groupements amine libres est importante et plus il est soluble. La viscosité augmente également avec la concentration et elle est fonction de la MM des chaînes macromoléculaires. Comme pour les autres polysaccharides, la viscosité chute lorsque la température augmente.

#### 5. Comportement du chitosane en milieu acide :

Le chitosane est l'un des rares polyélectrolytes naturels cationiques et il est une base faible présentant un pKa voisin de 6,3. Il se dissout en milieu acide par protonation des fonctions amine présentes sur la macromolécule [30]. En dessous de ce pKa, les groupements amines sont protonés et font du chitosane un polyélectrolyte cationique, soluble dans l'eau acidifiée [31]. Au dessus du pKa, les groupements amines sont déprotonés et le chitosane est insoluble dans l'eau (Figure I.5). Le pKa du chitosane dépend du degré de neutralisation des groupes  $\text{NH}_3^+$  et du DDA. En général, la valeur du pKa augmente quand le DDA diminue [30].



**Figure I.5:** structures du chitosane en milieu acide (A) et en milieu neutre (B) [32]

## **6. Propriétés de biocompatibilité du chitosane :**

La biocompatibilité d'un polymère est d'une importance fondamentale pour une utilisation thérapeutique [33]. Le chitosane est biocompatible c'est-à-dire que sa présence dans un organisme entraîne des réactions inflammatoires et des réactions de rejet très limitées (propriétés immunologiques). La biocompatibilité du chitosane est caractérisée principalement par trois propriétés : sa non toxicité, sa cytocompatibilité et son hémocompatibilité.

### **6.1 Biodégradabilité :**

La biodégradation du chitosane est assurée par des enzymes qui l'hydrolysent en oligomères. Chez l'Homme et les mammifères, ce rôle est assumé principalement par des lysozymes [34] qui dégradent les liaisons (1-4) glycosidiques des unités N-acétylglucosamine en des résidus N-acétylglucosamine et D-glucosamine, métabolisés ensuite dans l'organisme. Un chitosane de DDA 50 % est ainsi facilement dégradé in vivo dans le sang et les tissus, sans accumulation dans le corps [35].

La dégradation dépend de l'origine et des propriétés du polysaccharide (DDA, masse molaire...) [36]. Une étude plus approfondie a montré d'abord une augmentation de la susceptibilité enzymatique pour les DD inférieure à 50 %, puis une augmentation avec le DDA, et finalement une absence de dégradation pour un chitosane de DDA 97 % [37]. Cette influence du DD est également constatée, in vitro (Dégradation par des lysozymes) et in vivo (implantation sous cutanée) [38], Un chitosane de DDA 50 % semble donc permettre une dégradation optimale.

### **6.2 Cytocompatibilité :**

La cytocompatibilité du chitosane vis-à-vis des fibroblastes, des kératinocytes, des chondrocytes et des ostéoblastes a été démontrée in vitro. Lors de cultures cellulaires sur un film de chitosane, la croissance des cellules dépend des caractéristiques et de la source du chitosane. Des travaux montrent que, quel que soit le DA (2-50 %), la mise en contact prolongée de films de chitosane avec les fibroblastes et les kératinocytes n'induit ni la destruction, ni la croissance anarchique de celles-ci, et qu'aucune substance cytotoxique n'est relarguée dans le milieu [39]. Le même comportement est constaté dans le cas de cultures de chondrocytes et de kératinocytes sur un film de chitosane de DA 2,5 % [40] et de culture de chondrocytes et d'ostéoblastes sur une surface similaire de DA 10 % [41].

## **7. Propriétés biologiques :**

Le chitosane présente l'avantage de réunir des propriétés très intéressantes. En effet, il inhibe la croissance de nombreux parasites et il réduit le développement des infections : c'est un bon agent antibactérien et antifongique [42]. De plus, le chitosane a des propriétés antitumorales, antivirales, ainsi que des propriétés cicatrisantes remarquables [43]. Il augmente la vitesse de cicatrisation des plaies ouvertes et la reconstruction des tissus tout en prévenant les infections microbiennes. Enfin, le chitosane non seulement stimule la croissance cellulaire, mais il peut également être utilisé comme substrat pour la culture cellulaire (les cellules adhèrent au matériau et le colonisent) [44].

### **7.1 Propriétés antibactériennes :**

Le mécanisme d'action du chitosane contre les bactéries est jusqu'à aujourd'hui mal connu. Cependant, il existe plusieurs éléments qui peuvent expliquer cette action, ces éléments sont regroupés dans le tableau I.3.

**Tableau I.3:** Les hypothèses d'action antibactérienne de chitosane.

Action	Référence
La formation des liaisons électrostatiques entre les charges positives du chitosane et les phospholipides de la membrane cellulaire qui ont une charge négative, perturbant ainsi les échanges entre la cellule microbienne et le milieu extérieur.	[45], [46], [47]
La présence du chitosane peut aussi entraîner des déformations morphologiques au niveau de la paroi cellulaire.	[48], [49], [50].
L'inhibition peut aussi être due à l'enrobage des cellules microbiennes par le chitosane, éliminant ainsi tout échange avec le milieu extérieur	[44].
L'action du chitosane peut aussi se faire par formation de liaison avec les protéines et les électrolytes présents dans le cytoplasme	[51], [49].
Formation des liaisons entre le chitosane et l'ADN des bactéries et l'inhibition de la synthèse des ARN messager	[45], [46]
Le chitosane peut aussi agir de façon indirecte sur les bactéries et les moisissures, et cela par complexation des métaux nécessaires pour leur croissance	[50]

En générale, l'action du chitosane sur les bactéries à Gram négatif est moins importante que celle sur les bactéries à Gram positif. Ce résultat est probablement dû à des différences dans la structure de l'enveloppe cellulaire [52-53]. La paroi cellulaire des bactéries Gram-négatif est constituée d'une fine couche de peptidoglycane et d'une membrane externe composée de lipopolysaccharides, de lipoprotéines et de Phospholipides. Cependant, la paroi cellulaire des bactéries Gram-positif est seulement composée d'une épaisse couche de peptidoglycane sans membrane externe. En raison de cette structure, la membrane externe fonctionne comme une barrière imperméable contre les macromolécules et les substances hydrophobes. Elle pourrait être responsable de la prévention de la pénétration du chitosane dans la cellule, expliquant ainsi l'activité antibactérienne plus faible sur les bactéries Gram-négatif que sur les bactéries Gram-positif [54].

### **7.2 Propriétés antifongiques :**

Le mécanisme d'action du chitosane contre les souches fongiques est jusqu'à aujourd'hui mal connu. Cependant, il existe plusieurs éléments qui peuvent expliquer cette action :

- Le chitosane peut interagir avec la membrane des cellules pour altérer leur perméabilité. Par exemple, la fermentation avec la levure boulangère est inhibée par certains cations, qui agissent sur la surface des cellules de la levure en empêchant l'entrée du glucose [55].
- Le chitosane agit aussi comme un agent chélatant qui forme des complexes avec les traces de métaux et inhibant ainsi la croissance des champignons et la production des toxines [56]. Il assure aussi certains processus de la défense à l'extérieur de la cellule par exemple, il agit comme un agent absorbant d'eau et inhibe l'activité des différents enzymes [57]. Il est trouvé que l'utilisation du chitosane à partir d'une concentration de 1 g/L réduit considérablement la croissance des souches fongiques suivante : *Cylindrocladium floridanum*, *Cylindrocarpon destructans* et *Fusarium oxysporum*.

### **7.3 Propriété cicatrisante du chitosane :**

L'activité cicatrisante de chitosane est avérée dans la réparation tissulaire de l'épiderme [58] et la cicatrisation [41]. De ce fait, le chitosan est utilisé pour fabriquer des pansements et des bandages [59]. Par exemple, un mélange de chitosan et oxychitine est commercialisé comme agent de recouvrement pour les greffes, le HemCon® Bandage.

Dans le mécanisme d'action cicatrisante du chitosane, **Okamoto et coll.** [60] ont montré que le chitosane agit sur toutes les étapes de cicatrisations. Son premier rôle est de favoriser l'hémostase, le chitosane stimule ensuite la prolifération des fibroblastes et influe le comportement migratoire des neutrophiles et des macrophages, ce qui a pour conséquences de modifier les processus de reconstruction que sont la fibroplasie et la réépithélialisation [60,61].

**Ueno et coll.** [62] ont étudié aussi l'influence de non-tissés de chitosane sur la cicatrisation des plaies chirurgicales chez les chiens. Là encore, il a été mis en évidence que le chitosane favorise, dès le troisième jour, l'infiltration des macrophages et des cellules inflammatoires, et plus particulièrement polymorphonucléaires. Cette étude a également montré que le chitosane favorise l'étape de granulation entre le 9<sup>ème</sup> et le 15<sup>ème</sup> jour en outre la quantité de collagène dans les tissus reformés est significativement plus importante pour les plaies soignées avec du chitosane.

#### **7.4 Propriétés antivirales :**

Le chitosane peut inhiber les infections virales dans différents systèmes biologiques. Il est également capable d'induire une résistance à certaines infections virales chez les cellules végétales et animales. De plus, il permet de prévenir le développement de l'infection par des bactériophages dans des cultures microbiennes infectées [63]. Cette activité dépend du degré de polymérisation, le degré de N-désacétylation, la valeur de charge positive, et le caractère des modifications chimiques de la molécule [64].

Le mécanisme de cette activité est mal compris. En générale, le chitosane peut inhiber la réplication des bactériophages par plusieurs mécanismes: diminuer la viabilité des cultures de cellules bactériennes, neutraliser le pouvoir infectieux de particules de phage matures dans l'inoculum et / ou des particules de phage fille, et bloquer la réplication du phage virulent [65].

#### **7.5 Propriétés antitumorales :**

L'activité antitumorale du chitosane est issue de sa structure chimique qui contient deux groupements actifs (groupements amine au niveau du C<sub>2</sub> et groupements hydroxyles au niveau du C<sub>3</sub> et du C<sub>6</sub>). En fait, les interactions entre les charges positives du chitosane (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) et des charges négatives sur les membranes des cellules cancéreuses et les jonctions serrées augmentent la perméabilité et permettent aux médicaments adsorbés sur le chitosane

de pénétrer dans les cellules cancéreuses [66]. Pour l'activité antitumorale, le chitosane doit être soluble dans l'eau au pH physiologique avec des groupements amines protonés. [67].

L'activité antitumorale du chitosane augmente avec la diminution du poids moléculaire, du degré désacétylation, de la viscosité et donc avec l'augmentation de la solubilité dans l'eau [68, 69]. De plus, les oligomères de chitosane ont également un effet antitumoral en empêchant la croissance des cellules tumorales par stimulation du système immunitaire [70].

### **7.6 Propriétés antioxydantes**

En raison des atomes d'hydrogène protique des groupements amines au niveau de carbone C<sub>2</sub> ou hydroxyles au niveau des carbones C<sub>3</sub> et C<sub>6</sub> du chitosane, ce biopolymère a une activité antioxydante formant des radicaux macromoléculaires [69].

Les degrés de polymérisation et de désacétylation (DD) sont les éléments clés de l'activité antioxydante du chitosane. En effet, le chitosane à faible poids moléculaire a une activité antioxydante très importante en comparaison avec le chitosane à poids moléculaire élevé dans lequel les atomes d'hydrogène protique sont bloqués [71]. Par exemple, un poids moléculaire allant de 1 à 3 kDa et un degré de désacétylation de 90 % ont été corrélés avec une haute capacité antioxydante [72].

## **8. Principales applications du chitosane dans le Domaine biomédical et pharmaceutique :**

Les nombreuses propriétés biologiques du chitosane en font un candidat de choix pour les applications pharmaceutiques, biomédicales et cliniques: agent antimicrobien, hémostatique, pansement cicatrisant... Il est également utilisé comme système de libération contrôlée d'agents thérapeutiques par voie orale, transdermique, oculaire et nasale. Il présente en effet de bonnes propriétés muco-adhésives et une absence de toxicité qui le prédisposent à des utilisations en thérapie génique et pour la vaccination. Le chitosane possède un caractère hémostatique ainsi que des propriétés cicatrisantes remarquables [43]. Le chitosane est un agent important en médecine classique, notamment comme « véhicule » de médicaments et d'autres substances thérapeutiques, et en médecine régénérative (chirurgie reconstructrice par exemple) [44]. Dans de nombreuses applications, le chitosane est utilisé sous forme d'hydrogels chargés pour immobiliser des médicaments, des enzymes ou encore des substances thérapeutiques comme les vaccins, les antigènes ou gènes.

**Tableau I.4:** applications du chitosane dans les domaines biomédical et pharmaceutique [74]

Champs d'application	Applications
Médecine	accélération de la cicatrisation et de la guérison des blessures.
Chirurgie plastique	stimulation de la régénération des tissus (prolifération des cellules).
Biologie cellulaire	agent hémostatique, agent anti-infectieux, agent anti-tumeur, encapsulation de cellules et de facteur de croissance...
Pharmacie	relargage de médicaments
Ophthalmologie	crèmes de soin, lentilles de contacts
Alicaments	complément alimentaire (produits amaigrissants).
Dentisterie	gel dentaire.
Chirurgie dentaire	Implants dentaires.

## **II.1 la peau et la cicatrisation**

### **II.1.1. Introduction :**

La peau humaine est un organe complexe essentiel à la protection de l'organisme des agressions physiques, mécaniques, chimiques et biologiques de l'environnement et participe aussi à la définition psychologique de l'individu.

La peau constitue l'organe le plus important volumineux du corps humain. Avec une surface environ 2 m<sup>2</sup> et un poids d'environ 5Kg en moyenne. Outre ses propriétés barrière (mécanique, thermique, chimique, bactérienne), elle assure une variété d'autres fonctions comme la réception de messages thermique et sensoriels, permet la dissipation de la chaleur, et régule les pertes hydriques et assure le stockage des graisses [75].

### **II.1.2. Anatomie de la peau :**

La peau est composée de trois couches principales:

- L'épiderme
- Le derme
- L'hypoderme

#### ➤ **Épiderme :**

L'épiderme est la couche superficielle de la peau qui est en contact direct avec l'environnement extérieur et elle protège l'organisme contre celui-ci. Elle est en fait la couche protectrice de la peau qui empêche les agents pathogènes d'envahir l'organisme et qui maintient l'eau et les nutriments à l'intérieur. Elle a une épaisseur moyenne de 100 µm, mais celle-ci peut varier considérablement selon la région du corps. Par exemple, l'épiderme des paupières n'a que 50 µm d'épaisseur tandis que l'épiderme de la plante des pieds peut avoisiner le millimètre. [76]

Il est constitué de 4 couches superposées (la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse, la couche cornée) et se caractérise par un aspect pavimenteux, kératinisant et stratifié. Il est recouvert d'un film de surface, «le film hydrolipidique» constitué principalement de lipides et d'eau jouant un rôle dans l'hydratation, la protection, l'aspect et l'odeur de chaque individu. [77]

➤ **Le derme :**

Le derme est un tissu conjonctif constitué d'une substance fondamentale dans laquelle baignent des cellules, des fibres de collagène et des fibres élastiques. Son épaisseur est de 0,2 – 0,3cm. Il contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques et des nerfs.

A part de son rôle de soutien, le derme assure la nutrition de l'épiderme (parce qu'il est richement vascularisé), mais aussi joue un rôle dans la régulation de la température, de la pression et de la sensation de douleur. Il assure également un rôle de réservoir en eau [78].

➤ **L'hypoderme :**

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau et constitue 15 à 20 % du poids corporel. C'est un réseau de cellules graisseuses (adipocytes) qui sont regroupées sous forme de lobules et attachées au derme par des fibres de collagène et d'élastine. On y trouve aussi des fibroblastes et des macrophages. Elle agit comme isolant thermique, protège contre les chocs et constitue aussi un réservoir énergétique [79].

### **II.1.3. Physiologie de la peau humaine :**

La peau permet le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Ses fonctions peuvent être divisées en 3 catégories majeures : la fonction barrière, le contrôle de la température et la fonction de la réparation.

➤ **La fonction de barrière**

La peau assure une barrière efficace entre le milieu intérieur et l'environnement extérieur, et protège les organes internes d'influences externes. Elle prévient la perte en eau et empêche la pénétration des substances toxiques et pathogènes. Elle protège aussi contre les forces mécaniques (la fonction d'élasticité).

➤ **Le contrôle de la température**

La peau joue un rôle essentiel dans la régulation de la température ; cette dernière est régulée par la transpiration et par le flux sanguin. Le flux sanguin 250-300 cm<sup>3</sup>.min-

peut augmenter jusqu'à  $6000-8000 \text{ cm}^3.\text{min}^{-1}$  en réponse à une élévation de la température. [80]

➤ **La protection contre les facteurs extérieurs et la réparation :**

La peau contient des structures qui confèrent la sensibilité au toucher (cellules de Merkel et nocicepteurs), l'immunité (cellules de Langerhans), la protection contre les radiations UV (mélanocytes), la réparation et le métabolisme. Enfin, la peau est un organe vivant en continuelles régénération et réparation. Son renouvellement dure 28 jours. Il est continu et peut être accéléré en cas des blessures. [79]

**II.1.4. Les plaies et cicatrisation cutanée :**

Une plaie se définit comme une rupture de l'intégrité de la peau caractérisée par une perte de substance cutanée plus ou moins importante. Une perturbation de l'intégrité de la peau peut survenir dans plusieurs contextes. La peau peut subir des dommages lors de chirurgies, de brûlures, de radiations, de coupures, d'abrasions, de frottements, de pincements et de pressions. Le degré de gravité de la blessure varie selon certains facteurs comme l'étendue, la profondeur et la nature.

Selon le degré de gravité, il existe deux types de plaies principales, les plaies superficielles et les plaies profondes. [81]

**II.1.4.1. Les trois types de plaies:**

➤ **Les plaies de premiers degrés :**

Les blessures du premier degré ne concernent que l'épiderme, elles se manifestent par une suppression des kératinocytes situés à la surface de la plaie, l'épiderme se trouve alors plus au moins aminci. Elles ne sont pas douloureuses que quelques jours et le pronostic évolutif est rapidement favorable. Ces lésions proviennent la plupart du temps d'une légère brûlure d'un coup de soleil ou d'une petite abrasion.

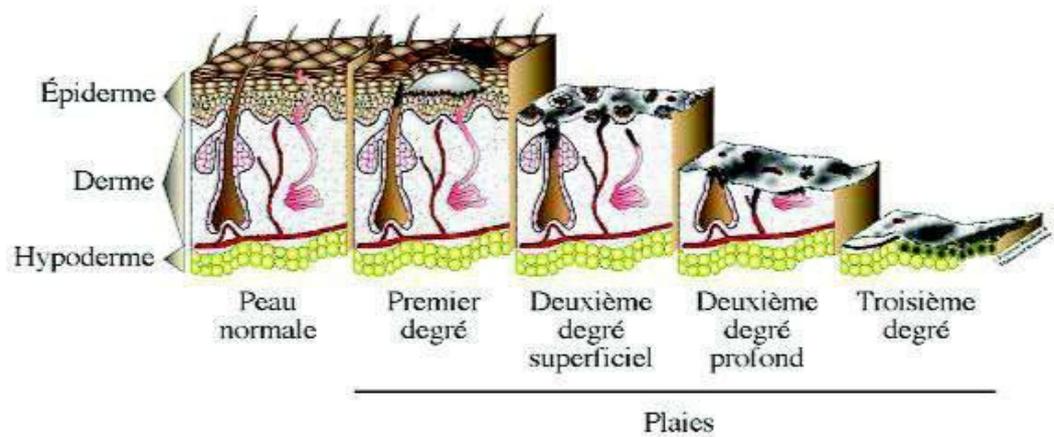
➤ **Les plaies de deuxième degré :**

Les blessures du second degré sont caractérisées par la destruction de l'épiderme, de la couche basale et d'une partie du derme. La blessure ayant touché les corpuscules basaux, vaisseaux et d'autres cellules importantes, les terminaisons nerveuses de la douleur s'activent. Les blessures du second degré sont donc souvent

très douloureuses. Ce type de blessure est généralement causé par une brûlure importante, une abrasion de la peau ou une coupure.

➤ **Les plaies de troisième degré :**

Les blessures du troisième degré sont les plus graves : elles se manifestent par une destruction complète de l'épiderme et du derme avec bien souvent atteinte de l'hypoderme. Ces lésions sont très graves car de nombreuses structures sont touchées et bien souvent détruites. Ces blessures résultent dans la majorité des cas d'une brûlure importante, d'une coupure ou abrasion profonde. [82]



**Figure II.1 :** Classification des plaies en fonction de leur profondeur. [81]

**II.1.4.2. Phénomènes de cicatrisation de la peau :**

L'épiderme guérit par régénération grâce au renouvellement naturel des kératinocytes.

Le derme guérit par réparation, le tissu d'origine étant remplacé par un nouveau tissu non spécifique avec une formation d'une cicatrice.

Dès qu'une lésion atteint le derme, les vaisseaux sanguins sont endommagés. Il se produit alors un épanchement de sang dans la plaie. Afin de refermer la blessure et de limiter les pertes sanguines, de nombreux mécanismes visent à stopper ou retenir l'hémorragie se mettent en place, on nomme l'ensemble de ces mécanismes l'hémostase. Cette hémostase est précédée d'un phénomène d'inflammation. [82]

Afin de maintenir les fonctions essentielles de la peau, il est très important de la réparer lorsqu'un tel événement survient. La guérison de plaies cutanées est un événement dynamique coordonné qui implique la multiplication cellulaire, la migration cellulaire active

et la production de matrice extracellulaire [83,84]. Elle implique donc différents processus qui doivent être respectés pour assurer la réparation.

## **II.2. Généralité sur les produits parapharmaceutique :**

### **II.2.1. Définition d'un produit pharmaceutique:**

L'article L.5111-1 du Code de la Santé Publique définit le médicament comme « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques » .[85.86]

### **II.2.2. Généralité sur les produits pharmaceutique :**

Un médicament agit par un ou plusieurs constituants appelés principes actifs.

#### ➤ **Principe Actif :**

Le principe actif (P.A.) est une substance douée de propriétés thérapeutiques, il est le support de l'activité pharmacologique.

Il existe deux catégories de principes actifs : Les substances obtenues par synthèse dont les caractéristiques chimiques sont bien définies (ex : acide acétylsalicylique, caféine, digitaline) et les substances extraites à partir des produits naturels : végétal, minéral, biologique. [87]

#### ➤ **Excipient**

Il s'agit de plusieurs substances responsables de la forme pharmaceutique et sans action pharmacologique. [85]

Les excipients utilisés sont extrêmement nombreux, ce qui explique d'une part, la diversité des caractéristiques physiques et chimiques des principes actifs, dont ils doivent être les auxiliaires, et d'autre part, la variété des rôles qu'ils ont à jouer : Faciliter l'administration du principe actif, améliorer l'efficacité du principe actif et assurer la stabilité, etc. [88]

Une seule propriété commune à tous les excipients est l'inertie vis-à-vis du principe actif, du matériau de conditionnement et de l'organisme.

Les excipients utilisés en pharmacie sont très nombreux : Les excipients minéraux, les excipients organiques. Alcool éthylique Glycérol ou l'eau. Les glycérides, Cires,

Sucres, dérivés de sucre et macromolécules, Surfactifs, Conservateurs, colorants et aromatisants. [89.88.90]

### **II.2.3. Les émulsions :**

Une émulsion est un système comprenant au moins deux liquides non miscibles, dont l'un est dispersé dans l'autre, sous une forme plus ou moins stable. Une émulsion est souvent décrite comme une dispersion de gouttelettes de l'une des phases dans l'autre. On distingue donc une phase dispersée et une phase continue.

Pour que l'émulsion soit durable (c'est-à-dire que l'état dispersé demeure lorsque l'agitation mécanique cesse), il est nécessaire d'utiliser un agent émulsionnant ou émulsifiant. Son rôle est de stabiliser le système dispersé en inhibant les phénomènes de dégradation. Les tensioactifs, les polymères et les solides divisés sont des agents émulsionnants. Ceux les plus largement utilisés sont les tensioactifs.

#### **II.2.3.1. Les différents types d'émulsions :**

##### ➤ **Selon la taille des gouttelettes :**

- Les **macroémulsions** ou **émulsions** : Le diamètre moyen de ces émulsions classiques est supérieur ou égal au micromètre. Compte tenu de leur taille, et en fonction de la viscosité de la phase continue, les gouttes des émulsions sédimentent (ou crèment) sous l'effet de la gravité.
- Les **nano/mini émulsions** : ces deux termes sont utilisés pour nommer des systèmes biphasiques, de taille de gouttes comprises entre 20 et 200 nm [91]. Les nanoémulsions sont transparentes ou translucides à l'œil et sont stables à la sédimentation ou au crémage. La préparation des nanoémulsions exige l'utilisation de méthodes hautement énergétiques, comme la microfluidisation. [92]
- Les **microémulsions** : ce terme est utilisé aujourd'hui pour désigner un système monophasique dans lequel un tensioactif particulièrement performant rend possible la coexistence, à l'échelle quasi moléculaire, des phases eau et huile. Se sont des systèmes thermodynamiquement stables.

➤ **Selon la dispersion des phases aqueuses et huileuses :**

1. Les émulsions simples sont appelées eau-dans-huile (E/H) quand des gouttelettes d'eau sont dispersées dans la phase huileuse, et huile-dans-eau (H/E) pour l'inverse.
2. Les émulsions multiples sont symbolisées par h/E/H ou e/H/E; h (respectivement e) indique la phase la plus interne et H (respectivement E) indique la plus externe. Les phases h et H ou e et E peuvent être identiques ou différentes.
3. Les biémulsions sont des émulsions contenant deux différentes phases internes de gouttelettes, soit de même nature (mais de taille différente), soit de nature différente (quelque soit la taille).

**II.2.3.2. La Stabilité des émulsions :**

Les émulsions sont thermodynamiquement instables car leur décomposition résulte d'une diminution d'énergie libre. Cependant les mécanismes cinétiques impliqués dans la démixtion des 2 phases peuvent être si lents que l'émulsion peut être considérée comme stable.

La stabilité d'une formulation revêt plusieurs aspects : physiques, chimiques et microbiologiques. Pour être stable physiquement, l'émulsion ne doit pas montrer de démixtion, qui peut être provoquée soit par de la coalescence, soit par un phénomène de crémage/sédimentation. La stabilité physique inclut aussi une invariance du comportement rhéologique et de la granulométrie.

La stabilité chimique repose sur le fait qu'aucun des composants de l'émulsion ne doit participer à une réaction chimique pouvant soit modifier de manière grave la stabilité physique, soit perturber les propriétés applicatives (aspect, couleur, odeur, efficacité).

Enfin, la formulation, pour être stable microbiologiquement, ne doit pas être un milieu de culture pour levures, moisissures, et germes bactériens.

Différents mécanismes de rupture existent, ils peuvent être réversibles ou irréversibles. [92]

➤ **Sédimentation et crémage :**

Ce mécanisme résulte de la différence de densité entre phase dispersée et phase continue. On parle de crémage quand il s'agit d'une ascension de la phase dispersée et de sédimentation quand la phase dispersée chute. C'est un phénomène réversible : l'interface existe toujours, il suffit d'agiter pour revenir à l'émulsion.

➤ **Floculation :**

Ce mécanisme résulte de l'agrégation des gouttelettes due aux interactions attractives. L'énergie d'interactions entre les particules est due à la somme des forces de répulsions électrostatiques et au potentiel d'attraction de type Van der Waals. Ce phénomène peut être réversible lorsque l'attraction est peu énergétique ou irréversible lorsqu'elle est très énergétique.

➤ **Coalescence :**

Ce mécanisme, irréversible, résulte de la rupture du film interfaciale entre les gouttes de la phase dispersée. Deux ou plusieurs gouttes fusionnent pour former une goutte plus grosse. Le processus se répétant, l'aire interfaciale devient de plus en plus petite et la phase dispersée démixte, et à terme on revient au système diphasique de départ. C'est un processus énergétiquement favorable.

### **II.2.3.3. Les émulsions topiques :**

- Les lotions sont en général moins visqueuses et possèdent une plus grande fraction aqueuse. D'un point de vue pharmacologique,
- Les émulsions huileuses, quant à elles, provoquent une sensation « grasse » et chaude après application et laissent la peau brillante.
- Les lésions suintantes sont généralement traitées avec des émulsions H/E parce qu'elles pénètrent facilement sur des surfaces humides.
- Les crèmes topiques sont visqueuses et semi-solides et sont généralement des émulsions H/E (crèmes aqueuses) ou E/H (crèmes huileuses).

Les crèmes huileuses sont plutôt prescrites sur des peaux sèches, dans des conditions favorables à la prolifération bactérienne, parce que les propriétés occlusives des émulsions E/H tendent à réhydrater la peau. En plus, les crèmes huileuses génèrent souvent une augmentation de la pénétration du médicament du fait de l'hydratation des couches supérieures. Ainsi la réponse clinique de tous les médicaments appliqués de manière topique est plus efficace quand occlusive, c'est pourquoi les émulsions E/H sont les plus utilisées. [93]

Les crèmes aqueuses et les lotions tendent à être préférées par les patients car elles sont facilement applicables, rafraîchissent et pénètrent bien la peau.

#### **II.2.3.4. Mécanismes d'absorption à travers la peau :**

La peau est apparue comme un portail de délivrance de médicaments, et le nombre de médicaments topiques est en constante progression. Au départ les formulations étaient réalisées pour des traitements locaux de pathologies cutanées. [93]

La surface extérieure de la peau constitue une barrière très efficace mais elle peut cependant être traversée par de petites quantités de substances lipophiles capables de pénétrer dans les couches cornées. Si ces substances possèdent aussi une certaine hydrophilie, elles pourront avoir une diffusion plus profonde et même parfois une absorption systémique. En dessous de la couche cornée, l'épiderme est une barrière moins efficace, sa perméabilité étant comparable à celle des autres membranes biologiques. Du fait de la perméabilité réduite de la peau, il n'y a qu'une faible fraction de la substance déposée qui est réellement absorbée et seules les substances très actives peuvent avoir une action générale par cette voie. [88]

## **Matériels :**

### **1. Chitosane :**

Définit au chapitre précédent (Partie théorique : Chapitre I : La chitine et le chitosane).

### **2. L'huile d'amande douce :**

- ✓ Nom latin : Prunus amygdalus, Prunus dulcis
- ✓ INCI : PRUNUS AMYGDALUS DULCIS OIL

C'est un classique des huiles de soin pour la peau. Avec son faible taux d'insaturation, elle ne rancit pas vite et c'est l'une des meilleures et des plus douces huiles de base pour les crèmes, les produits nettoyants et les huiles de bain. Son odeur neutre constitue un autre avantage. Assouplissante, adoucissante, calmante et nourrissante, elle convient parfaitement aux peaux les plus délicates comme celles des bébés. Elle est également idéale pour soigner les vergetures, protéger les seins lors de l'allaitement ou les mains séchées par le froid de l'hiver. En revanche, elle est comédogène donc déconseillée aux peaux grasses et/ou sujettes aux boutons. [94]

L'huile d'amande douce est riche en différentes vitamines, mais surtout en vitamine A et en vitamine E elle est aussi très riche en minéraux et contient du potassium, du phosphore, du calcium, du magnésium, de fer, de zinc et du cuivre.

### **3. Le beurre de karité :**

- ✓ Nom Latin: Butyrospermum parkii.
- ✓ INCI: BUTYROSPERMUM PARKII BUTTER.

Le beurre de karité est une substance hybride qui se situe entre la cire et l'huile. Il est doté de formidable vertus soignantes, grâce à son taux élevé d'insaponifiables : 15%, alors que les huiles dans leur grande majorité n'en contiennent que 1 à 2%. Ces insaponifiables sont très précieux : ils pénètrent bien dans la peau, qu'ils assouplissent, fixent l'eau et favorisent l'absorption des autres principes actifs. [94]

### **4. La cire d'abeille**

- ✓ INCI : CERA ALBA
- ✓ Famille : Cire : Solide ou liquide
- ✓ Origine : Animale

La cire produite par les abeilles ouvrières sert à fabriquer les rayons de la ruche et à former les alvéoles remplies de miel. Cette cire renferme de la propolis (5 à 10%) et des grains de pollen. La cire jaune est obtenue en faisant fondre dans l'eau bouillante, les rayons préalablement vidés de leur miel. Elle sert de facteur de consistance des phases grasses auxquelles elle apporte un caractère occlusif qui réduit la perte en eau de la peau. A faible concentration, elle augmente la consistance des émulsions ; à forte concentration, elle stabilise certaines crèmes en leur conférant une grande viscosité (cérats), et permet même d'obtenir des préparations de consistance solide. Elle entre également dans la composition des cires dépilatoires. [94]

### **5. Lécithine de soja :**

➤ Origine : huile de soja

La lécithine de soja est un émulsifiant végétal très intéressant pour ses propriétés émoullientes et son excellente affinité avec la peau. Les lécithines sont des émulsifiants naturels présents notamment dans les fèves de soja, les graines de tournesol et de colza, mais aussi dans le jaune d'œuf. Les lécithines couvrent une large gamme de HLB variant de 2 à 12, ce qui permet de choisir celle qui sera la plus adaptée au type d'émulsion choisie.

La lécithine que nous avons utilisée est une lécithine de soja déshuilée contenant 95% de phospholipide avec une HLB=8, soluble dans l'eau. Incorporée dans les émulsions, elle en augmentera la stabilité tout en conservant une texture plutôt fluide, au toucher très soyeux. De plus, c'est un émulsifiant très bien toléré par les peaux sensibles. La lécithine a la particularité de colorer légèrement les crèmes en jaune.

### **6. L'hydrolat de lavande :**

✓ Nom Latin : *Lavandula angustifolia*

✓ INCI: LAVANDULA ANGUSTIFOLIA FLOWER WATER

Hydrolat de lavande, plus communément appelé « eau florale », contient les mêmes composés volatils présents dans les huiles essentielles mais en quantité moindre (moins de 5%), en plus des composés hydrosolubles. Cet eau florale constitue fréquemment la partie aqueuse de base de produit bio mais peut également s'appliquer directement sur le visage comme tonique avant la crème.

Elle est très douce, purifiante, apaisante, elle permet de calmer le feu du rasoir [95].

## **7. Conservateur bio (extrait de pépin de pamplemousse):**

Souvent désigné par l'abréviation EPP, ce conservateur d'origine naturelle permet de prolonger la durée de vie des produits cosmétiques qui contiennent une phase aqueuse laits, crèmes, gels douche...

Conservateur antibactérien et antifongique à large spectre, assure la conservation des préparations cosmétiques contenant une phase aqueuse (eau, hydrolat).

La formulation de notre crème thérapeutique a été effectuée en présence de chitosane qui est l'élément le plus important pour cette formulation. Afin d'assurer un bon produit on s'est proposé de faire l'extraction au laboratoire à partir de matière première qu'est les carapaces de crevette rouge.

### **III.1.2 Méthodes :**

#### **III.1.2.1. Extraction de la chitine :**

La matière première utilisée pour cette étude est l'exosquelette de crevettes rouge, elles sont décortiquées à température ambiante, les carapaces sont ensuite lavées puis séchées à l'aire libre. Les fragments obtenus sont séchés à 100°C pendant 24 h puis broyés et triés sur tamis afin de séparer plusieurs tailles. Le broyage et le tamisage des fragments ont donné des particules d'un diamètre variant majoritairement entre : 0,1 mm et 0.5 mm.

L'extraction chimique consiste en une déminéralisation acide et une déprotéinisation basique.

##### **A. Déminéralisation :**

La déminéralisation s'effectue en dispersant la matière première obtenue dans une solution d'acide chlorhydrique 1.5 M (1 :10) (m : v) sous agitation constante pendant 1 h à Température ambiante, la réaction produit un violent dégagement de gaz carbonique qui doit être maîtrisé en ajoutant graduellement la matière première ainsi que l'ensemble doit être ouvert .Théoriquement. La réaction se termine lorsqu'il n'y a plus de dégagement gazeux .le contenu est ensuite filtré sur papier whatman et rincé abondamment à l'eau distillée.

##### **B. Déprotéinisation :**

Le résultat est introduit dans un flacon en prix, dans lequel est ajouté (1 :10) (m : v) d'NaOH (1,25M) à une température de 90 °C pendant 18 heure. Le contenu du flacon est à nouveau filtré et rincé abondamment à l'eau distillée.

### **C. Blanchiment :**

Après le rinçage à l'eau distillée, un autre rinçage avec un volume de 20 ml de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est réalisé pour faire blanchir le produit, ensuite, un ultime rinçage à l'acétone permet d'entraîner les impuretés lipidique résiduelles. Le contenu du flacon est à nouveau rincé abondamment à l'eau distillée et ce jusqu'à ce que le pH de l'eau du lavage atteigne la neutralité, le filtrat est alors transféré dans une coupelle préalablement pesée qui sera par la suite placée en étuve à 30°C pendant 20 heures et en suite à 90°C pendant 12 heures.

Le nouveau poids de la coupelle. Contenant le produit sec permet de déduire le rendement massique d'après la formule suivante :

$$Rm = \frac{m_f}{m_i} \cdot 100 \dots\dots\dots \text{III.1}$$

#### **III.1.2.2. Préparation du chitosane :**

Le chitosane a été obtenu par désacétylation de la chitine extraite par une solution de soude selon le mode opératoire suivant :

La chitine a été traitée avec une solution de soude à 50%, dont la proportion (m:v) (1 :10), la solution est agitée pendant 24 heures à 100°C.

La solution est ensuite filtrée, le chitosane retenu est lavé en continu, afin d'éliminer la soude résiduelle, et ce jusqu'à ce que le pH de l'eau du lavage atteigne la neutralité, le chitosane est rincé avec l'eau distillée puis séché à l'étuve à 80°C pendant 24 h.

#### **III.1.2.3. Caractérisations physico-chimique du chitosane:**

##### **➤ Teneur en eau :**

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

La teneur en eau est évaluée selon la formule suivante :

$$\% \text{ Humidité} = \frac{\text{Poids humide (g)} - \text{Poids de l'échantillon sec (g)}}{\text{Poids de l'échantillon humide (g)}} \times 100 \dots\dots \text{III.2}$$

➤ **Teneur en cendres :**

Le principe de la détermination de la teneur en minéraux repose sur leur résistance à la chaleur, Environ 1 g d'échantillon est pesé dans une feuille de papier en aluminium de poids connu, elle est repliée et placée au moins 5 h à température égale 500°C.

Après refroidissement, elle est de nouveau pesée, chaque mesure est répétée trois fois.

La teneur en cendres est évaluée selon la formule suivante :

$$\% \text{ cendre} = \frac{\text{poids du résidu calciné (g)}}{\text{Poids de l'échantillon sec (g)}} * 100 \dots\dots\dots\text{III.3}$$

➤ **Teneur en lipides :**

La teneur en lipides totales est déterminée selon la méthode de Foch et al (1957) [96] en duplicata. Environ 5 g d'échantillon est ajoutés à 100 ml d'une solution de chloroforme:méthanol (2:1, v/v).

L'échantillon à analyser et le solvant sont introduits dans un erlenmayer à hauteur de (1 : 20) (substrat solide/volume en ml), après 1h agitation, le produit est filtré sous vide à travers un verre fritté indice 3, le filtrat est introduit dans une ampoule à décanter, du NaCl à 0.9% (w/v) est ajouté à hauteur de 0.2 (v/volume totale), le mélange décante jusqu'à l'obtention d'un système biphasique net. L'ampoule est dégazée plusieurs fois, puis la partie huileuse située dans la phase inférieure est versée dans un ballon préalablement pesé, le contenu du ballon est distillé sous rotavapor (pression 220 bars), puis séché sous azote. Enfin le poids du ballon est pesé, la teneur en lipides est déterminée avec la formule suivante :

$$\% \text{ lipides} = \frac{M_2 - M_0 \text{ (g)}}{M_1} \dots\dots\dots\text{III.4}$$

Avec:

- M<sub>0</sub> ; poids de ballon
- M<sub>1</sub> ; pesé d'essai
- M<sub>2</sub> ; poids du ballon contenant les lipides sèches après extraction

➤ **Test de solubilité :**

Le chitosane extrait est testé pour leur solubilité dans les milieux acides, basique, neutre. Selon Ngah et Fatinthan [97] le teste de solubilité a été réalisé dans 5 % (v / v) de l'acide acétique, 0.5 de NaOH et de l'eau distillée.

On pèse environ 0,05 g de produit ajouté à 50ml de ses trois solutions séparément, et les laisser sous agitation pendant 24 heure.

Nous avons effectué la solubilité de chitosane à différents concentrations de 0.1% jusqu'à 0.01%.

➤ **Mesure du degré d'acétylation Par titrage potentiométrique :**

La détermination potentiométrique du degré d'acétylation était suivant un titrage acido-basique comme décrit par Tolaimate et al [17], avec pH mètre de marque « OHAUS Starter 2C » muni d'une électrode sensible.

Cela consiste à dissoudre 0.2 g de chitosane dans 20 ml d'HCl (0.1M) et 25 ml d'eau distillée sous agitation 30 min, puis, ajouter encore 25 ml d'eau distillée et sous agitation 30 min jusqu'à la dissolution totale du chitosane.

Titre avec la solution NaOH (0.1M) tout en introduisant la sonde du pH mètre dans la solution, tracer la courbe  $pH = f(V_{NaOH})$ .

On détermine le DD du chitosane par la méthode de titrage potentiométrique, qui a été calculé à partir de la formule Czechowska –Biskup [98]:

$$DDA\% = 2.03 * \frac{V_2 - V_1}{m + 0.0042(V_2 - V_1)} \dots\dots\dots III.6$$

Avec :

- m ; masse du chitosane (g)
- $V_1$  et  $V_2$  ; volume de NaOH ajouté correspondants aux deux points d'inflexion (ml)
- 2.03 Coefficients résultats du poids moléculaire de l'unité de monomère de chitosane.
- 0.0042 Coefficient résultats de la différence entre le poids moléculaire du monomère acétylé et la masse moléculaire désacétylé.

Les mesures ont été réalisées sur une large gamme de vitesses de cisaillement variant de 0,01 à 1000 s<sup>-1</sup>. Ces séries de mesure ont été réalisées deux fois pour chaque masse molaire avec des solutions-mères nouvelles chaque fois. [99]

➤ **Caractérisation par diffraction rayon X (DRX) :**

La diffraction des rayons X est utilisée dans l'étude de la cristallinité des différents matériaux.

La méthode générale consiste à bombarder l'échantillon avec des rayons X, et à regarder l'intensité de rayons X qui est diffusée selon l'orientation dans l'espace. La déviation structurée de ce rayon-X sur les cristaux permet de déterminer le taux de cristallinité. [100]

L'indice de cristallinité ( $I_{Cr}$ ) indique la proportion de zone cristalline dans l'échantillon de chitosane, Cette technique distingue les zones cristallines et les zones amorphes. Pour déterminer l'indice  $I_{Cr}$  d'après les résultats de diffraction. La méthode se base sur le rapport entre la somme totale des aires des zones cristallines sur la somme totale des aires. [101]

➤ **Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB) :**

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique de microscopie électronique basée sur le principe des interactions électrons-matière, capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon. Le principe du MEB consiste sur l'émission d'un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet des électrons et des photons. Ainsi, un faisceau d'électrons primaire frappe la surface de l'échantillon et les photons réémis sont remplacés par tout un spectre de particules ou par rayonnements : électrons secondaires, électrons rétrodiffusés, électrons des rayons X. Ces particules ou rayonnements apportent différents types d'informations sur la matière dont est constitué l'échantillon. La qualité des images obtenues en microscopie électronique à balayage dépend grandement de la qualité de l'échantillon analysé.

La morphologie de l'échantillon du chitosane a été observée avec un microscope électronique à balayage pour prévoir sa structure et sa cristallinité.

➤ **Caractérisations biologique de chitosane : Activité antifongique et**

**Antibactérienne :**

Nous avons vérifié l'activité antifongique et antibactérienne du chitosane à différents concentrations (1% - 2%) sur quelques souches de bactéries et champignons dans lequel :

➤ **Les souches de champignons :**

- ✓ *Candidas albicans*

- ✓ *Aspergillus fumigatus*
- ✓ *Saccharomyces cerevisiae*

➤ **Les souches des bactéries:**

- ✓ *Escherichia coli*
- ✓ *Staphylococcus aureus*
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa*
- ✓ *Bacilles*

➤ **Protocole expérimental**

La méthode adoptée pour ce test est celle de la diffusion : couler aseptiquement le milieu de culture gélosé Sabouraud pour les champignons et le milieu de culture gélose MH (Mueller-Hinton) pour les bactéries dans des boîtes de pétri à raison de 15 ml par boîte. On laisse refroidir et solidifier sur la paillasse puis on ensemence les 3 champignons dans des boîtes différentes. et aussi les 4 bactéries dans des boîtes différentes.

➤ **Dépôt de disques**

A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque en papier wattman de 6 mm de diamètre et l'imbiber avec la solution du chitosane à tester à différentes doses (0.5% - 0.1%), en mettant seulement en contact le bout du disque, celui-ci va absorber progressivement l'EBC jusqu'à l'imprégnation totale du disque, puis déposer sur la gélose.

Les boîtes de pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30mn et mises à l'étuve à la température de 28°C pendant 72h. Dans les boîtes de contrôle, les disques sont trempés dans de l'eau distillée stérile. L'expérience est répétée deux fois pour chaque dose testée.

➤ **Lecture**

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle en (mm).

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des champignons vis-à-vis des concentrations testées de notre solution.

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre >20mm

#### **III.1.2.4. Formulation de la crème bio:**

- **Préparation de la phase aqueuse:** La phase aqueuse de notre crème est un hydrolat de lavande. Pour cela on pèse 5g de lavande auquel on ajoute de l'eau distillé jusqu'à 100g, puis on chauffe dans un bain marie. L'hydrolat est obtenu après filtration.
- **Préparation de la phase huileuse :** La phase huileuse est un mélange (Cire d'abeille, Beurre de karité et l'huile d'amande douce, ces derniers ont été met dans un bain marie à 70°C, jusqu'à fusion complète des composants, après on ajoute une quantité précise de principe actif (chitosane).
- **Emulsifiant :** Afin d'augmenter la stabilité de la crème on a recours à l'utilisation émulsifiant hydrosoluble (la lécithine) dans la phase aqueuse (hydrolat).

Notre crème a été obtenue, on versant la phase aqueuse dans la phase huileuse. Une agitation mécanique peut assurer la bonne homogénéisation des deux phases.

On introduit à la fin de la préparation de la crème à raison de:

- ✓ Un arôme pour parfumer,
- ✓ Pépin de pamplemousse comme conservateur

#### **III.1.2.5. Caractérisation de la crème :**

Pour la fiabilité et l'évaluation de la qualité de notre produit aux normes bien définies ; il est recommandé de réaliser les tests de validation suivantes :

##### **1. La stabilité:**

La stabilité de notre formulation à la cour du temps et sous des conditions physique rigoureuse est déterminée en utilisant une centrifugeuse régler à une vitesse de 3600 tours/min pendant 10 min.

##### **2. Homogénéité :**

Une certaine quantité de crème est étalée sur une lame puis recouverte d'une lamelle pour une observation microscopique.

Ce test permet d'apprécier l'homogénéité de l'émulsion ou la distribution des gouttelettes dans l'émulsion et pour cela nous avons utilisé un microscope optique avec un grandissement de  $10 \times 100 = 1000$ .

### 3. Le pH :

L'acidité de la crème formulé est très importante à connaître étant donné que cette dernière est destinée à être appliquée sur la peau du corps d'une manière et sur la peau du visage particulièrement. Cette acidité est généralement interprétée par la mesure du pH.

### 4. Influence de la température :

Pour le test de stabilité, nous avons déposé un échantillon de notre crème dans une étuve à 50°C pendant 24 h afin de mesurer sa stabilité microbiologique au cours du temps. La stabilité des produits pharmaceutiques est un des paramètres clé pour la garantie de sa qualité et pour la satisfaction du consommateur.

### 5. La viscosité :

L'objectif assigné est de caractériser le comportement rhéologique de la crème qui est en écoulement variable afin de déterminer le modèle rhéologique auquel elle obéit.

La procédure se résume à faire varier la vitesse de cisaillement ( $\gamma$ ).

Le rhéogramme obtenu donne la variation de la viscosité en fonction de la vitesse de déformation.

Ce test rhéologique nous permet de déterminer la viscosité de nos essais ainsi de faire la comparaison avec celle de la crème de référence et pour cela nous avons utilisé un rhéomètre de marque Anton Paar Modulat Compact Rheometer MCR 302, relié à un bain thermostaté et commandé à un logiciel qui permet de traiter les données.



**Figure III.1:** Rhéomètre Anton Paar Modulat Compact Rheometer MCR 302.

## **6. contrôle sensoriel :**

Après sa fabrication, en avant sa commercialisation, chaque produit pharmaceutique doit passer par une analyse sensorielle qui permet de mesurer les perceptions sensorielles d'un produit en se reposant sur un avis objectif, celui d'un consommateur consentant. Pour que cette analyse ait plus de valeur, il est nécessaire de la reproduit sur le maximum de personne possibles. Ainsi l'analyse sensorielle consiste à étudier de manière ordonnée et structurée les propriétés d'un produit afin de pouvoir le décrire, de la classer ou de l'améliorer d'une façon extrêmement objective et rigoureuse.

La définition officielle de l'analyse sensorielle consiste à analyser les propriétés organoleptiques des produits par les organes des sens.

Afin de vérifier la qualité sensorielle de notre crème on a fait un sondage de 20 personnes sur les six critères suivantes :

- ✓ **Glissant** : la rapidité de l'étalement de la crème sur la peau (liée à la vitesse de l'étalement).
- ✓ **Pénétration** : la diffusion de la crème dans la peau (liée à la vitesse de diffusion).
- ✓ **Richesse** : sensation de l'épanouissement de la peau après l'application de la crème (liée à l'épanouissement de la peau).
- ✓ **Onctuosité** : la crème est en même temps douce et épaisse (liée à la structure de la crème).
- ✓ **Effet filmogène** : la formation d'un filme sur la peau.
- ✓ **Douceur après application** : la sensation d'une peau lisse après l'application de la crème sans qu'il y'es une sensation d'excès de gras.

### **III.2.1 Résultats d'extraction de chitosane :**

#### **III.2.1.1 Extraction de chitine et production de chitosane.**

##### **1. Préparation des carapaces:**

La matière première utilisée pour cette étude c'est l'exosquelette de crevette rouge, après le séchage des carapaces, la teneur en eau est égale 8%. Quelque soit la granulométrie des fragments.

##### **2. Préparation de chitine :**

L'extraction chimique de chitosane consiste 3 étapes principales ; déminéralisation, déprotéinisation, et blanchiment.

Le rendement massique après l'extraction de chitine égale 20.02%.

##### **3. Préparation du chitosane « désacétylation » :**

Cette étape est réalisée à partir la désacétylation de la chitine préparé, cette dernière est traitée avec une solution basique (50%).

Le chitosane obtenu de couleur légèrement jaunâtre, et le rendement massique après la désacétylation est égale 69.12%.

#### **III.2.1.2 Caractérisation physico chimique de chitosane :**

Après l'étape de l'extraction, le chitosane doit subir à quelques analyses physico-chimiques, telle que la détermination de la teneur en eau, la teneur en minéraux (cendres) et la teneur en lipides. Les résultats de la caractérisation sont regroupés dans le tableau III.1.

**Tableau III.1 :** Résultat des caractéristiques de chitosane.

Caractéristiques	Chitosane extrait
Teneur en eau (%)	6.26
Teneur en cendre (%)	3
Teneur en lipide (%)	2

Selon les résultats de tableau III.1 on remarque que la qualité de notre produit est ultra pure avec une pureté de 95%, cette pureté dépend de la quantité des minéraux et des lipides restantes dans le produit

### 1. Test de solubilité

L'intérêt porté à la solubilité du chitosane est justifié par la nécessité de dissoudre la substance afin de prendre connaissance de ces domaines d'application.

Le tableau III.2 regroupe les valeurs de la solubilité du chitosane commercial et le chitosane préparée au laboratoire.

**Tableau III.2 :** Résultat de test de solubilité du chitosane extrait et commerciale

Solution	Chitosane extrait	Chitosane commerciale
Acide acétique	Soluble	Soluble
Eau	Insoluble	Insoluble
NaOH	Insoluble	Insoluble

Effectivement le chitosane est insoluble dans l'eau distillée et dans les solvants alcalins concentrée ou diluée [103], cette insolubilité s'explique par la grande masse moléculaire de chacune des chaînes de polymères et aussi par la formation de liaisons hydrogènes entre les différents groupes fonctionnels portés par chacune des unités, par contre il est soluble en milieu aqueux acide grâce à la protonation de ses fonctions amine, son meilleur solvant est l'acide acétique.

Toujours dans le cadre de la vérification de la solubilité du chitosane extrait au laboratoire et commerciale une dissolution de ces dernier à différente concentration d'acide acétique a été effectuée, le résultat est présenté dans le tableau III.3.

**Tableau III.3 :** Résultat du test de solubilité du chitosane extrait et commerciale à différente concentration d'acide acétique.

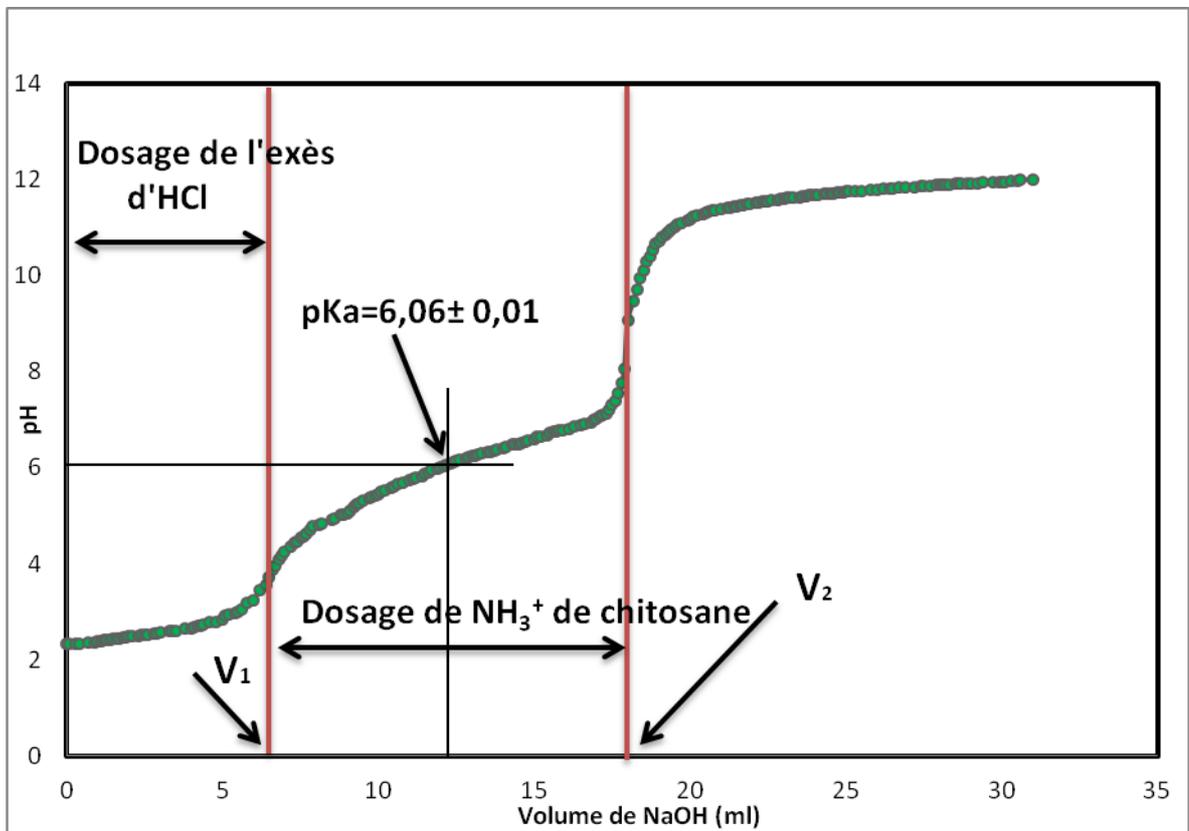
	Chitosane extrait	Chitosane commerciale
Concentration (M)	Temps (min)	Temps (min)
0.1	15	4
0.05	30	10
0.04	30	15
0.03	30	20
0.02	40	Insoluble
0.01	45	Insoluble

La différence liée à la solubilité des deux types de chitosane est liée au degré de désacétylation, lorsque le DDA est peu élevé, le chitosane est peu soluble, cette différence nous permet de déduire que le DDA du chitosane extrait est plus élevé que celui chitosane commerciale, ce qui a été vérifié dans la suite de notre travail.

## **2. détermination du degré désacétylation et du pKa du chitosane par dosage pH-métrique**

La détermination du DDA par dosage pH-métrique s'effectue selon la méthode de (Tolaimate et al 1990).

Dans cette méthode, le chitosane a été solubilisé dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl) (0.1M) et ensuite dosé par une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) (0.1M), la mesure de changement de pH permet de tracer la courbe présente à la Figure III.3



**Figure III.3** : Courbe du dosage potentiométrique du chitosane extrait.

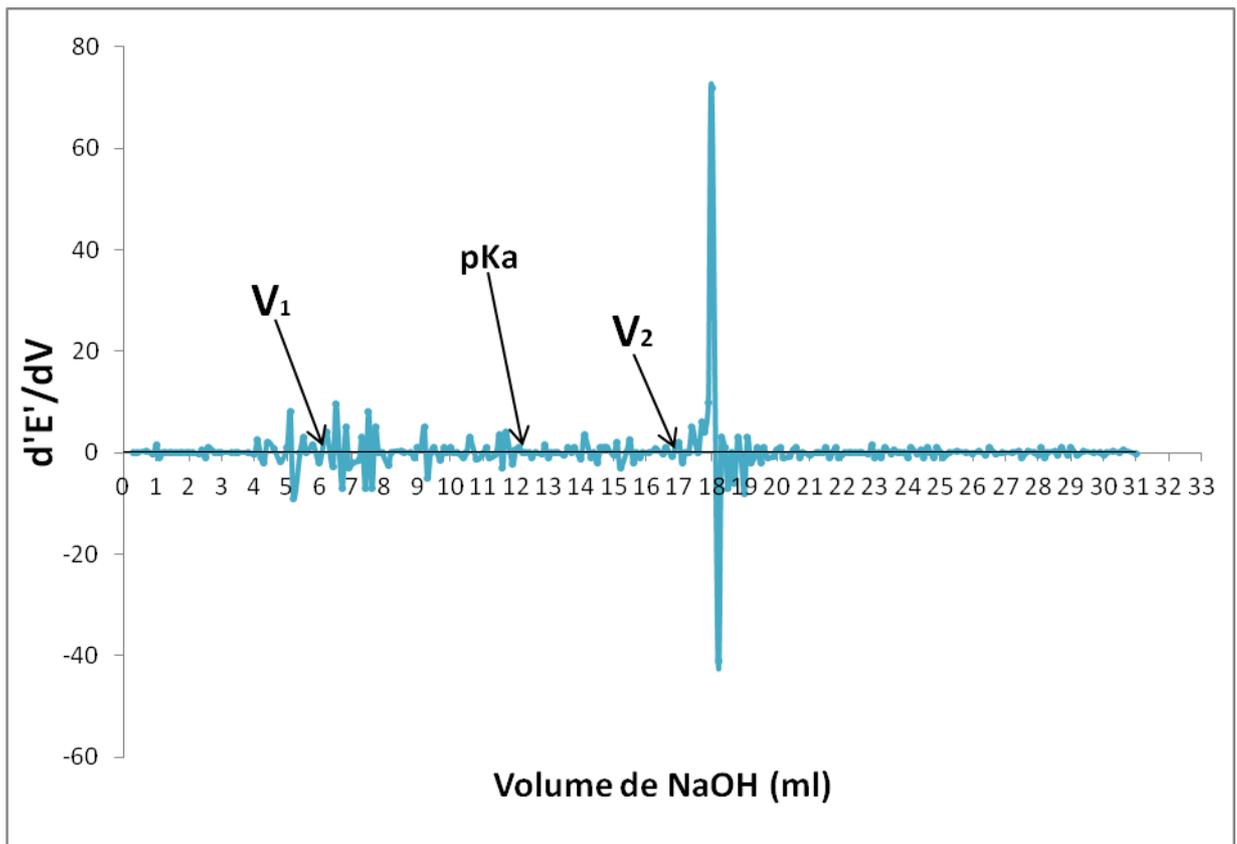
La figure III.3 présente une courbe avec deux points d'inflexions correspond à  $V_1$  et  $V_2$ , la différence de volume de NaOH entre ces deux points lié à la quantité de HCl

nécessaire pour protoner les groupements amine ( $\text{NH}_2$ ) du chitosane. Ainsi deux zones sont distingués sur cette courbe, la première zone correspond au dosage l'excès de HCl et la second correspond au dosage des fonctions amine de chitosane ( $-\text{NH}_3$ ) qui se déprotonés au fur et à mesure de l'ajout de titrant (NaOH).

Le calcul du DDA du chitosane se fait selon la formule (III.06) et de l'ordre de 93%.

Tandis que le pKa est égale au pH correspond au point de demi neutralisation ou la concentration des groupements ( $-\text{NH}_3$ ) est égale à la concentration des groupements ( $\text{NH}_2$ ) du chitosane, ce qui nous permet de déterminer graphiquement le pKa à partir du premier point d'inflexion (situe entre  $V_1$  et  $V_2$ ).

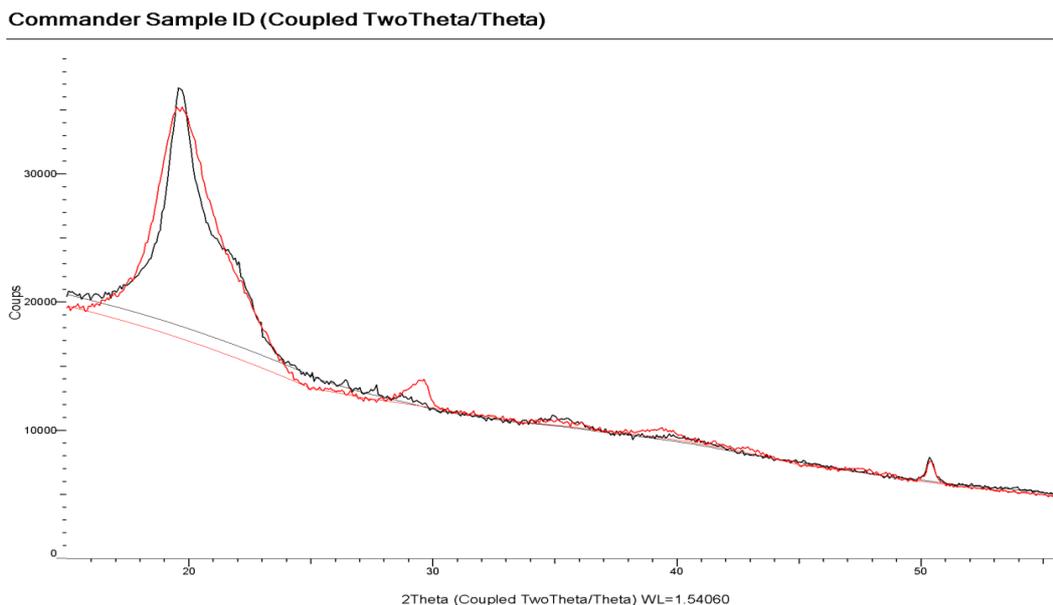
Dans notre cas le pKa est égale  $6.06 \pm 0.01$  (Figure III.3 et Figure III.4)



**Figure III.4:** dérivée seconde du dosage potentiométrique du chitosane extrait

### 3. Caractérisation par diffraction rayon X (DRX)

L'analyse de DRX a été effectuée pour détecter l'état de cristallinité du chitosane extrait et du chitosane commerciale.



**Figure I11.5:** diffractogramme de chitosane commerciale et extrait

On remarque une légère différence entre les diffractogrammes du chitosane extrait et commerciale.

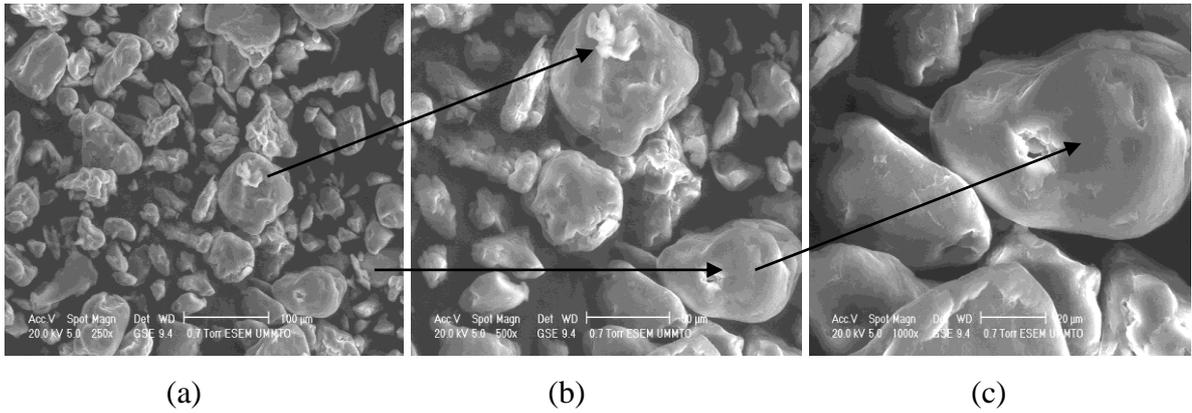
Le chitosane extrait montre un pic intense de réflexion autour de  $2\theta = 20^\circ$  dans le rang de  $2\theta = 15$  à  $40^\circ$ , ce pic est aussi observé dans le diffractogramme du chitosane commerciale, mais il est moins intense que ce dernier. En plus est légèrement déplacé vers les angles les plus élevés, ce qui explique la différence entre les valeurs de degré de désacétylation du chitosane commerciale et chitosane extrait.

Tandis que le diffractogramme montre que la cristallinité du chitosane commerciale est moins importante que celle du chitosane extrait, ainsi la diminution de l'intensité de réflexion du pic du chitosane extrait indique la diminution des groupements acétamides.

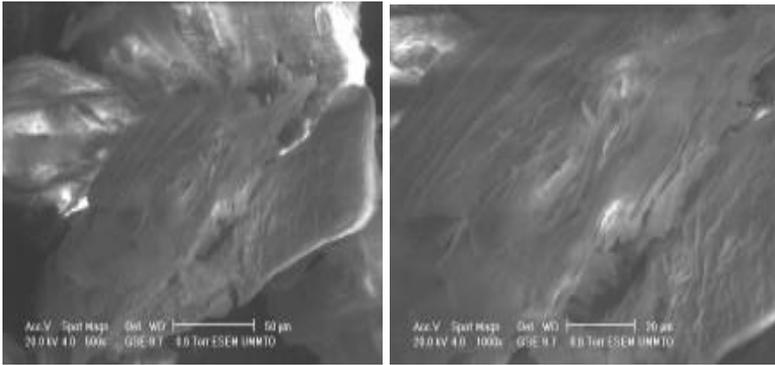
La technique adoptée pour déterminer l'indice de cristallinité consiste à calculer le rapport entre l'aire des pics associés aux zones cristallines sur l'aire totale, l'indice de cristallinité atteint donc 30.14% pour le chitosane extrait et 27.36% pour le chitosane commerciale.

#### **4. Caractérisation par microscope électronique à balayage**

L'image obtenue par microscope électronique à balayage du chitosane extrait et de la commerciale est présentée dans la Figure III.6 et la figure III.7.



**Figure III.6 :** image par microscope électronique à balayage du chitosane commerciale à différent dimensions : 100  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$



**Figure III.7 :** image par microscope électronique à balayage du chitosane commerciale à différent dimensions : 100  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$

Quatre points de comparaisons principales ont été observés dans cette analyse:

1. la taille des particules (diamètre moyen): les particules du chitosane commerciale sont de plus petites de taille que le chitosane issu d'extraction (environ 80  $\mu\text{m}$  pour le chitosane commerciale et 150-200  $\mu\text{m}$  pour le chitosane issu d'extraction).
2. la taille des particules (homogénéité de la taille): la taille de la particule pour chitosane commerciale est plus homogène que pour le chitosane issu d'extraction.
3. la géométrie des particules: le chitosane commerciale présente des particules de géométrie plus au moins ovoïde (la plus part des particules sont ovoïdes), la géométrie des particules du chitosane issu d'extraction est irrégulière et diffère d'une particule a une autre (des parallélépipèdes a bords irréguliers).
4. la porosité des particules: les particules du chitosane commerciale présentent de grand ports bien définis et des surfaces bien lisses et homogènes, au contraire des particules du chitosane issu d'extraction qui ne présente aucun port visible à cet grossissement et une surface complètement hétérogène.

Sur plan structure, les résultats obtenus préalablement sont prévisibles, effectivement les caractéristiques du chitosane commercial sont légèrement plus appréciables que ceux du chitosane issu d'extraction, cette différence est due à l'efficacité des procédés industriels bien étudiés préalablement optimisés et standardisés et surtout à la qualité de leurs équipements appliquant des technologies très performantes (comme le CO2 supercritique, etc...).

-cette comparaison peut être confirmée par des analyses complémentaires comme l'étude granulométrique (pour la détermination de la distribution granulométrique exacte et les diamètres moyens) ou encore les analyses de surfaces pour déterminer la porosité du chitosane (la microscopie électronique à balayage à des grossissements encore plus importants que ceux utilisés dans cette étude ou encore la BET).

**6. Résultats d'activité microbiologique de chitosane :**

**Tableau III.4 :** l'activité microbiologique du chitosane à 1 %

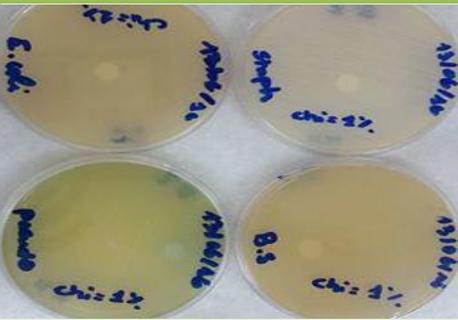
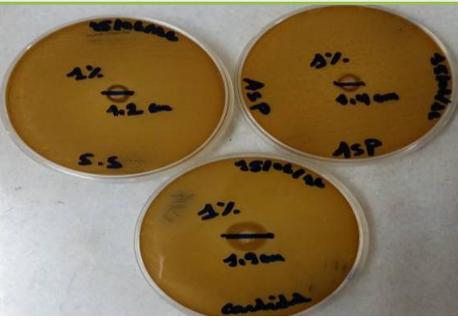
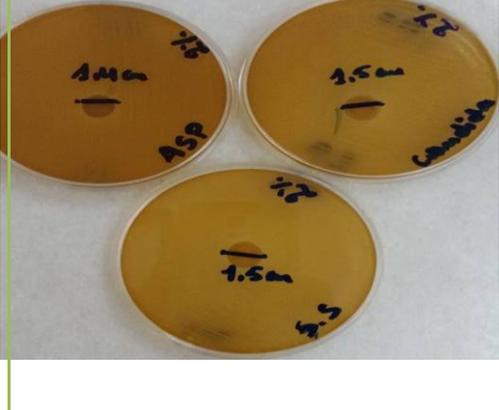
L'activité	Concentration du chitosane 1%	l'observation
<p><b>Les bactéries:</b>  <i>Escherichia coli</i>  <i>Staphylococcus aureus</i>  <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  <i>Bacilles</i></p>		<p>Non sensible (-)                      Non sensible (-)                      Non sensible (-)                      Non sensible (-)</p>
<p><b>de champignons :</b>  <i>Candidas albicans</i>  <i>Aspergillus fumigatus</i>  <i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>		<p>Très sensible (++)                      Sensible (+)                      Sensible (+)</p>

Tableau III.5 : l'activité microbiologique du chitosane à 1.5 %

L'activité	Concentration du chitosane 1.5%	l'observation
<b>Les bactéries:</b> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bacilles</i>		Très sensible (++) Sensible (+) Très sensible (++) Très sensible (++)
<b>de champignons :</b> <i>Candidas albicans</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Très sensible (++) Très sensible (++) Très sensible (++)

Tableau III.6: l'activité microbiologique du chitosane à 2 %

L'activité	Concentration du chitosane 2%	l'observation
<b>Les bactéries:</b> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bacilles</i>		Très sensible (++) Très sensible (++) Extrêmement sensible (+++) Très sensible (++)

<p><b>de champignons :</b></p> <p><i>Candidas albicans</i></p> <p><i>Aspergillus fumigatus</i></p> <p><b>Saccharomyces cerevisiae</b></p>		<p>Très sensible (++)</p> <p>Sensible (+)</p> <p>Très sensible (++)</p>
---	--	---

L'analyse des résultats montre une grande variabilité dans l'activité biologique du chitosane . Cette étude révèle que le chitosane à 1% ne présente aucune activité antibactérienne vis-à-vis des souches testées. Par contre nous avons noté une bonne sensibilité du candida albicans et une faible résistance d'Aspergillus fumigatus et Saccharomyces cerevisiea avec des diamètres d'inhibition respectives de 1.9 cm, 1.4 cm et 1.2 cm.

L'activité antimicrobienne du chitosane à des concentrations de 1,5 et 2% qui a été menée vis-à-vis des souches testées montre une sensibilité très significative avec des zones d'inhibition assez importantes allant de 1.4 cm à 2 cm.

### **III.2.2 Formulation et caractérisation de la crème bio:**

Cette partie consiste à deux principales étapes :

- la première étape c'est la formulation d'une crème thérapeutique bio, pour cela on a effectué un balayage bidimensionnel des paramètres de formulation.
- La deuxième étape a été consacrée à l'étude comparative de la crème bio formulé au laboratoire avec une crème de référence.

Selon l'activité thérapeutique nous avons choisi 3 crème de référence (« Zeta » crème antibactérien, « mycoster » crème antifongique, « madécassol » crème cicatrisante).

#### **III.2.2.1 Formulation de la crème bio :**

Le balayage de formulation va nous permettre de choisir parmi une vaste palette de variables de formulation celle sur laquelle on va jouer pour fabriquer une émulsion de type donné. On peut le faire en changeant une ou plusieurs variable ou n'importe quelle combinaison la mieux appropriée, de simplicité expérimentale ou de toute autre contrainte.

Dans notre formulation le balayage doit être bidimensionnel, Afin d'avoir une émulsion de type huile dans l'eau, le rapport phase aqueuse ( $\phi_A$ ) /phase huileuse ( $\phi_H$ ) doit être égale ou supérieur à 1.

Nous avons proposé on se basant sur des travaux précédents (effectué au département Génie des procédés dans notre laboratoire de recherche) de prendre deux rapports,  $\phi_H / \phi_A = 70/30$  et  $\phi_H / \phi_A = 75/25$ .

Le beurre de Karité et la cire d'abeille représente une concentration  $\leq 7\%$  pour le rapport  $\phi_H / \phi_A = 70/30$  et  $\leq 5\%$  pour le rapport  $\phi_H / \phi_A = 75/25$  du total de la phase huileuse ( $\phi_H$ ), et le reste de cette dernière est l'huile d'amande douce, cette dernière est maintenue constante pour des valeurs dépendant des résultats du balayage des autres variables, sur l'ensemble des formulations, les quantités prise sont exprimés en masse.

Quand a la phase aqueuse, est composée essentiellement d'hydrolat avec lequel on mélange lécithine de Soja comme tensioactif (TA) d'un pourcentage  $\leq 0,5\%$ .

#### **1. Préparation de la crème sans principe actif:**

##### **➤ Formulation $\phi_H / \phi_A = 75/25$ et $\phi_H / \phi_A = 70/30$**

Le but de notre travail dans un premier été alors d'obtenir une crème stable contenant le moins possible de la phase huileuse, pour cela, on s'est proposé d'étudier les rapports  $\phi_A / \phi_H = 75/25$  et  $\phi_A / \phi_H = 70/30$ .

Pour cette étude nous avons variée la quantité de la cire d'abeille (CA) et du beurre de karité (BK), Cependant la somme des deux constituants devrait être égale 5% et 7% pour les rapports  $\phi_H/\phi_A=75/25$  et  $\phi_H/\phi_A=70/30$  successivement, et nous avons fixé le pourcentage d'huile d'amande douce (HAD) et du tensioactif (TA).

Les résultats de ces formulations représentées par leur état de stabiliser sont regroupés dans les tableaux III.7 et III.8.

**Tableau III.7 :** Proportions et résultats de formulations de la crème  $\phi_H/\phi_A=75/25$

Essais N°	HAD %	CA %	BK %	TA %	$\phi_A$ %	Stabilité
Essai N°= 1	20	2.5	2.5	0.5	75	Instable
Essai N°= 2	20	2	3	0.5	75	Instable
Essai N°= 3	20	3	2	0.5	75	Instable
Essai N°= 4	20	3.5	1.5	0.5	75	Instable
Essai N°= 5	20	1.5	3.5	0.5	75	Instable
Essai N°= 6	20	4	1	0.5	75	Instable
Essai N°= 7	20	1	4	0.5	75	Instable

**Tableau III.8:** Proportions et résultats de formulations de la crème  $\phi_H/\phi_A=70/30$

Essais N°	HAD %	CA %	BK %	TA %	$\phi_A$ %	Stabilité
Essai N°=1	23	3.5	3.5	0.5	70	Instable
Essai N°=2	23	3	4	0.5	70	Instable
Essai N°=3	23	4	3	0.5	70	Instable
Essai N°=4	23	5	2	0.5	70	Instable
Essai N°=5	23	2	5	0.5	70	Instable
Essai N°=6	23	6	1	0.5	70	Instable
Essai N°=7	23	1	6	0.5	70	Instable
Essai N°=8	23	4.5	2.5	0.5	70	Instable
Essai N°=9	23	2.5	4.5	0.5	70	Instable

Au fur et à mesure de la formulation de la crème, nous avons remarqué visuellement l'instabilité de notre crème avec une grande séparation de phases.

Pour cette raison nous avons proposé une variation de la concentration du tensioactif dans chacun des deux rapports afin d'obtenir une crème plus stable.

Donc le balayage a été effectué sur deux essais différents de rapport où nous avons choisi l'essai le plus instable pour cette formulation.

Nous avons gardé les proportions d'huile d'amande douce, cire d'abeille, et de beurre de karité, par contre nous avons changée la proportion de tensioactif ( $T=0.7\%$  et  $T=0.3\%$ ).

Les résultats de ces formulations représentées par leur état de stabiliser sont regroupés dans le tableau III.9.

**Tableau III.9** : Proportions et résultats de formulations de la crème avec différente concentration de tensioactif.

Les proportions	HAD %	CA %	BK %	TA %	$\phi A$	Stabilité
$\phi A/\phi H = 75/25$	20	1	4	0.7	75	Instable
$\phi H / \phi A= 70/30$	23	4.5	2.5	0.3	70	Instable

L'observation visuelle lors de la formulation indique que les crèmes préparées sont instable comme les précédents, lorsque nous avons conclu que aboutir à une crème stable avec ces deux rapports est impossible.

Alors nous avons proposé de changer les deux rapports  $\phi A/\phi H = 75/25$  et  $\phi A/\phi H=70/30$  par les rapports  $\phi A/\phi H= 55/45$  et  $\phi A/\phi H =50/50$  successivement, afin de diminuer la proportion de la phase aqueuse dans chacun des deux rapports mais, à conditions d'être la somme des proportions de la cire et du beurre de karité  $\leq 7\%$  car notre but maintenant c'est l'obtention d'une crème avec une faible quantité de cire.

➤ **Formulation  $\phi H / \phi A= 55/45$  et  $\phi H / \phi A= 50/50$**

Pour cette étude nous avons variée la quantité de la cire d'abeille (CA) et du beurre de karité (BK), Cependant la somme des deux constituants devrait être  $\leq 7\%$  pour les deux rapports et nous avons fixé le pourcentage de tensioactif (TA).

Le pourcentage d'huile d'amande douce (HAD) est maintenue constant pour des valeurs dépendant des résultats du balayage des autres variables.

Les résultats de l'étude de la stabilité sont résumés sur les tableaux III.10 et III.11 :

**Tableau III.10:** Proportions et résultats de formulations de la crème  $\varphi_H / \varphi_A = 55/45$ 

Essais N°	HAD %	CA %	BK %	TA %	QA %	Stabilité
Essai N°=1	38	3.5	3.5	0.5	55	Stable
Essai N°=2	38	3	4	0.5	55	Instable
Essai N°=3	38	4	3	0.5	55	Stable
Essai N°=4	38	5	2	0.5	55	Stable
Essai N°=5	38	2	5	0.5	55	Instable
Essai N°=6	38	6	1	0.5	55	Instable
Essai N°=7	38	1	6	0.5	55	Instable
Essai N°=8	38	4.5	2.5	0.5	55	Stable
Essai N°=9	38	2.5	4.5	0.5	55	Instable

**Tableau III.11 :** Proportions et résultats de formulations de la crème  $\varphi_H / \varphi_A = 50/50$ 

Essais N°	HAD %	CA %	BK %	TA %	QA %	Stabilité
Essai N°=1	43	3.5	3.5	0.5	50	Instable
Essai N°=2	43	3	4	0.5	50	Instable
Essai N°=3	43	4	3	0.5	50	Stable
Essai N°=4	43	5	2	0.5	50	Stable
Essai N°=5	43	2	5	0.5	50	Instable
Essai N°=6	43	6	1	0.5	50	Stable
Essai N°=7	43	1	6	0.5	50	Instable
Essai N°=8	43	4.5	2.5	0.5	50	Instable
Essai N°=9	43	2.5	4.5	0.5	50	Instable

Les tests de stabilité ont été effectués avec une centrifugeuse afin d'accélérer la séparation des deux phases, ainsi les essais qui présentent une bonne stabilité ont été repris sur le tableau III.12.

**Tableau III.12:** Les formulations représentant les crèmes stable.

Essais N°	HAD %	CA %	BK %	TA %	QA %	Stabilité
Rapport $\phi_H / \phi_A = 55/45$						
Essai N°=1	38	3.5	3.5	0.5	55	Stable
Essai N°=3	38	4	3	0.5	55	Stable
Essai N°=4	38	5	2	0.5	55	Stable
Essai N°=8	38	4.5	2.5	0.5	55	Stable
Rapport $\phi_H / \phi_A = 50/50$						
Essai N°=3	43	4	3	0.5	50	Stable
Essai N°=4	43	5	2	0.5	50	Stable
Essai N°=6	43	6	1	0.5	50	Stable

On remarque que des crèmes stable ont été obtenues pour les deux rapports (4 essais pour le rapport  $\phi_H / \phi_A = 55/45$  et 3 essais pour le rapport  $\phi_H / \phi_A = 50/50$ ). Il est a constaté que la stabilité est directement lié à la quantité de cire existante dans notre crème, cette dernière présente un état de stabilité pour des quantités de cire entre 3.5% jusqu'à 6%, avec un rapport  $BK/CA < 1$ .

## **2. Préparation de la crème avec le principe actif:**

Le deuxième but de notre travail a été de pouvoir introduire le principe actif qui est le chitosane à ces crèmes stables pendant leurs formulations. L'interrogation à ce moment, est ce que ces formulations gardent leurs stabilités ?

Pour cela nous avons effectué une étude dans lequel on a introduit le principe actif à ces crèmes avec différents concentrations : 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1%.

Le test de stabilité a été effectué à l'aide d'une centrifugeuse pour accélérer la séparation des phases, les résultats de l'étude de la stabilité avec le principe actif sont résumés sur les tableaux III.13 et III.14.

**Tableau III.13** : Proportions et résultats de formulation de la crème 50/50 avec différentes concentrations de chitosane 0.25% - 1%.

Essais N°	HAD%	CA%	BK%	TA%	QA%	CH%	Stabilité
Le chitosane 0.25%							
3	43	4	3	0.5	50	0.25	Stable
4	43	5	2	0.5	50	0.25	Stable
6	43	6	1	0.5	50	0.25	Stable
Le chitosane 0.5%							
3	43	4	3	0.5	50	0.5	Stable
4	43	5	2	0.5	50	0.5	Stable
6	43	6	1	0.5	50	0.5	Stable
Le chitosane 0.75%							
3	43	4	3	0.5	50	0.75	Stable
4	43	5	2	0.5	50	0.75	Stable
6	43	6	1	0.5	50	0.75	Stable
Le chitosane 1%							
3	43	4	3	0.5	50	1	Stable
4	43	5	2	0.5	50	1	Stable
6	43	6	1	0.5	50	1	Stable

**Tableau III.14** : Proportions et résultats de formulation de la crème 55/45 avec différentes concentrations de chitosane 0.25% - 1%.

Essais N°	HAD%	CA%	BK%	TA%	QA%	CH%	Stabilité
Le chitosane 0.25%							
1	38	3.5	3.5	0.5	55	0.25	Stable
3	38	4	3	0.5	55	0.25	Stable
4	38	5	2	0.5	55	0.25	Stable
8	38	4.5	2.5	0.5	55	0.25	Stable
Le chitosane 0.5%							
1	38	3.5	3.5	0.5	55	0.5	Stable
3	38	4	3	0.5	55	0.5	Stable
4	38	5	2	0.5	55	0.5	Stable
8	38	4.5	2.5	0.5	55	0.5	Stable

Le chitosane 0.75%							
1	38	3.5	3.5	0.5	55	0.75	Stable
3	38	4	3	0.5	55	0.75	Stable
4	38	5	2	0.5	55	0.75	Stable
8	38	4.5	2.5	0.5	55	0.75	Stable
Le chitosane 1%							
1	38	3.5	3.5	0.5	55	1	Stable
3	38	4	3	0.5	55	1	Stable
4	38	5	2	0.5	55	1	Stable
8	38	4.5	2.5	0.5	55	1	Stable

D'après les résultats de stabilités qui sont regroupé dans les tableaux (III.10 et III.11), nous avons remarqué que les crèmes ont été formulé garde leurs stabilité quelque soit la concentration de principe actif.

### **III.2.2.2 Caractérisation de la crème bio :**

#### **1. Influence de la température :**

Après l'étude de stabilité par centrifugeuse, l'influence de la température est un paramètre important pour garantir la qualité du produit et la satisfaction de consommateur. Nous avons fait un test de stabilité à la température, les résultats sont regroupés dans le Tableau III.15.

**Tableau III.15:** les Résultats de test de stabilité par température des différentes crèmes formulés

<b>Le rapport 50/50</b>						
Essais	3	4	6	3	4	6
CH%	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5
Stabilité	instable	Stable	instable	instable	Stable	Instable
Essais	3	4	6	3	4	6
CH%	0.75	0.75	0.75	1	1	1
Stabilité	instable	instable	instable	instable	instable	Instable

<b>Le rapport 55/45</b>								
Essais	1	3	4	8	1	3	4	8
CH%	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5
Stabilité	instable	instable	instable	instable	Stable	instable	instable	Instable
Essais	1	3	4	8	1	3	4	8
CH%	0.75	0.75	0.75	0.75	1	1	1	1
Stabilité	instable							

On remarque d'après les tableaux ci-dessus que sur les 28 formulations préparées seul trois on résistées au test de la température, ce sont les crèmes avec une concentration en chitosane inférieur à 0.5%. Ce qui nous permet de constaté que la présence de quantité importante de chitosane dans notre formulation à le désavantage de provoquer une instabilité de la crème lors de son exposition à forte température.

## **2. Détermination du pH :**

Le paramètre le plus important après l'étude de la stabilité est la teneur en pH de ces crèmes étant donné que le produit va être met en contact directe avec la peau. Pour cela, nous avons procédé à la mesure à l'aide d'un pH mètre. Tout d'abord, il est nécessaire de savoir que la valeur lue sur le pH mètre ne peut être retenue comme mesure que lorsqu'elle est stabilisée. La durée de stabilisation est en général de quelques secondes et elle varie en fonction de la nature de la solution ou de l'encrassement de l'électrode.

Les résultats de la mesure du pH des différentes crèmes sont regroupés sur le tableau III.16.

**Tableau III.16 :** Résultats de mesure du pH des différentes crèmes formulés

Le rapport 50/50					
Essai N°	Sans CH	CH= 0.25%	CH=0.5%	CH=0.75%	CH=1%
	pH	pH	pH	pH	pH
3	5.03	4.51	5.11	5.30	5.30
4	5.22	5.52	5.63	5.68	5.88
6	5.02	5.77	5.95	5.66	6.08
Le rapport 55/45					
1	5.29	5.70	5.63	5.71	5.48
3	5.08	5.61	5.51	5.34	5.61
4	5.19	5.42	5.82	5.67	5.74
8	5.42	5.50	5.38	5.63	5.80

Les valeurs des pH nous ont permis de sélectionner les formulations qui obéissent aux normes (5.5- 6.5). On remarque une majorité des crèmes formulés en présence de matière active présente un pH appréciable. Il est à noter que une légère augmentation du pH a été constaté en présence de chitosane, cela peut être expliqué par le fait que notre principe actif est de caractère basique, ce qu'il déjà était démontré au (III.2.1.2 : 3) avec un  $pK_a$  de 6.06 et donc un pH de 8.

A partir du test de stabilité par centrifugeuse, à la température et aux valeurs du pH obtenues, les essais qui rassemblent les trois critères à savoir une bonne stabilité et pH à la norme sont pris pour la suite de notre travail, ces derniers sont regroupés sur le tableau III.17

**Tableau III.17:** les Formulations représente les crèmes les plus stable avec meilleure pH

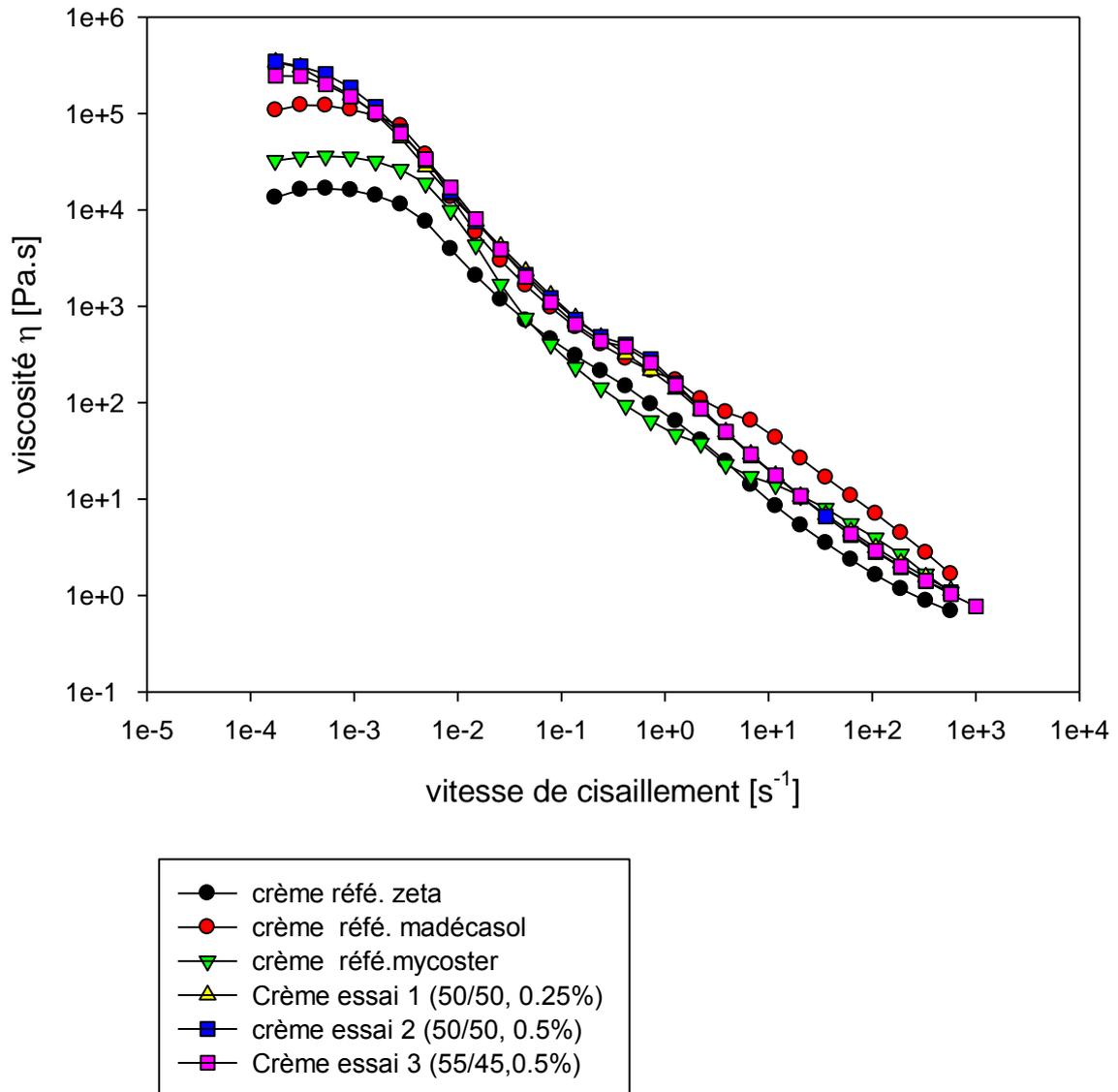
Le rapport 50/50								
Essais N°	HAD%	CA%	BK%	TA%	CH %	QA%	pH	Stabilité
4	43	5	2	0.5	0.25	50	5.63	Stable
4	43	5	2	0.5	0.5	50	5.52	Stable
Le rapport 55/45								
1	38	3.5	3.5	0.5	0.5	55	5.63	stable

### **3. Détermination de la viscosité et étude de l'écoulement par rhéologie :**

Après la formulation des crèmes leur comportement rhéologique a été étudié. Le rapport entre la rhéologie et la stabilité du produit, particulièrement dans le cas des émulsions, a été identifié comme un paramètre-clé dans la formulation de produit.

Les propriétés prédominantes et les valeurs des paramètres rhéologiques dépendent de la contrainte de cisaillement et sa durée de l'application.

L'analyse rhéologique en écoulement a été effectuée avec un rhéomètre type plan-plan, la vitesse de cisaillement a été imposée sur une fourchette de 0,001 à 1000 s<sup>-1</sup> avec une trentaine de prise d'essai. Le tracé de la viscosité en fonction de la contrainte de cisaillement est représenté sur le rhéogramme de la Figure III.8.



**Figure III.8:** rhéogramme des courbes d'écoulement des différentes crèmes formulés.

Sur rhéogramme de la Figure III.8 on remarque que toutes les formulations présentent un même comportement. D'abord à faible vitesse de cisaillement ( $<10^{-4}$ ) on observe clairement la présence d'un plateau exprimant un comportement newtonien, ce qu'il se traduit par le fait qu'à une telle vitesse de cisaillement les particules sont indéformables et résiste à la déformation donnant une viscosité constante.

Cela s'explique par la présence entre les macromolécules des interactions attractives type Van der Waals ou parfois appelé les interactions de rappel élastique et cela n'enregistre aucun changement sur le plan structural et donc la viscosité reste constante.

Pour une vitesse de cisaillement au-delà de  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , la viscosité chute brusquement expriment un comportement non newtonien (rhéofluidifiant), Ainsi, la courbe d'écoulement correspond à deux temps ; le premier à la manipulation de la crème (prise de la crème du réception) et la seconde à l'étalement de cette dernière. Il est à noter à partir du même rhéogramme que le comportement rhéologique des crèmes formulés au laboratoire est semblable à celui des crèmes de références.

Ainsi les valeurs de la viscosité apparente ont été déterminées à partir des modèles mathématiques, deux modèles ont été adopté ;

➤ **Modèle de Cross:**

$$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta - \eta_{\infty}} = \frac{1}{1 + (K \dot{\gamma})^P}$$

Avec  $\eta_0$  : viscosité à  $\dot{\gamma} \rightarrow 0$  [Pa.s]

$\eta_{\infty}$  : viscosité à  $\dot{\gamma} \rightarrow \infty$  [Pa.s]

K : constante de Cross

P : exposant de Cross  $P > 0$ .

On peut simplifier le modèle de Cross, en remplaçant  $\eta_{\infty}$  par 0, étant donné que la valeur de cette dernière est très petite devant  $\eta_0$ .

➤ **Modèle de Carreau:**

$$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta - \eta_{\infty}} = \frac{1}{(1 + (K \dot{\gamma})^2)^P}$$

Avec :

K : constante de Carreau

Les valeurs de la viscosité ont été présent en fonction du coefficient de corrélation ( $R^2$  tend vers 1) dans ce cas c'est le modèle de Carreau qui se rapproche le plus du comportement de notre crème. Ainsi la viscosité de nos crèmes ainsi que le coefficient de corrélation du modèle sont regroupés sur le tableau III.18

**Tableau III.18** : Résultats de la viscosité et des coefficients de corrélation des crèmes obtenus par le rhéomètre.

Essais N°	$\eta_0$ [Pa.s]	Coefficient de corrélation ( $R^2$ )
Essai 4	372620	0.960
Essai 4	356620	0.938
Essai 1	241520	0.927
Crème « Zêta »	14090	0.903
Crème « Madécassol »	119890	0.829
Crème « Mycoster »	36006	0.848

Selon les résultats du tableau III.18 on remarque que les valeurs de la viscosité des crèmes formulés sont quasi-constantes, alors que pour les crèmes de référence les valeurs de la viscosité varient d'une manière considérable. Ainsi le comportement et la viscosité des crèmes formulées se rapproche le plus de la crème commerciale « Madécassol ».

#### **4. Analyse sensorielle :**

L'analyse sensorielle est un paramètre très important liés directement à l'affinité de chaque consommateur. Pour que cette analyse ait plus de valeur, il est nécessaire de la reproduire sur le maximum de personnes possibles. Ainsi, l'analyse sensorielle consiste à étudier de manière ordonnée et structurée les propriétés d'un produit afin de pouvoir le décrire, de le classer ou de l'améliorer d'une façon extrêmement objective et rigoureuse. Pour cela chaque formulation a été tester sur 20 personnes, une moyenne de la notation attribué pour chaque critère (l'aspect, la richesse, diffusion, étalement, Onctuosité, effet filmogène) a été prise comme étant un critère de choix, les résultats de cette études sont regroupés sur le tableau III.19.

**Tableau III.19:** Moyenne des critères de l'analyse sensorielle des crèmes stables.

Critères Essais	Etalement	Aspect	Richesse	Ouctuosité	Diffusion	Film
Essai 04 (50/50) PA (0.25%)	3,975	4,025	3,5	3,6	3,425	3
Essai 04 (50/50) PA (0.5%)	3,925	4,25	3,9	3,4	3,525	3,2
Essai 01 (55/45) PA (0.5%)	3,8	3,975	3,725	3,2	3,65	3,2

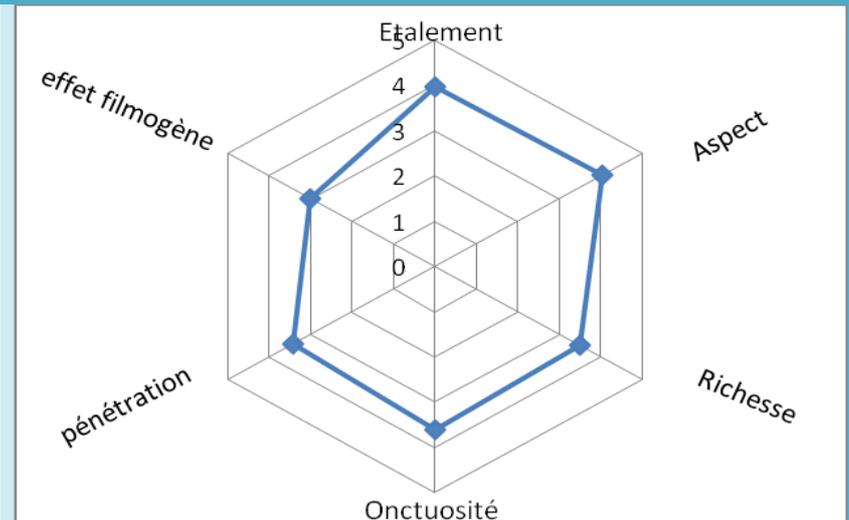
Puis, nous avons établis un profil sensoriel qui consiste à synthétiser, par un graphique, l'ensemble des informations dégagées par l'analyse sensoriel de chaque produit, ce dernier permet de voir plus clairement la formulation qui donne les meilleurs critères. L'ensemble des diagrammes sont représenté sur le tableau III.20.

**Tableau III.20 :** Diagramme des notes moyennes des critères de formulation obtenue par analyse sensorielles.

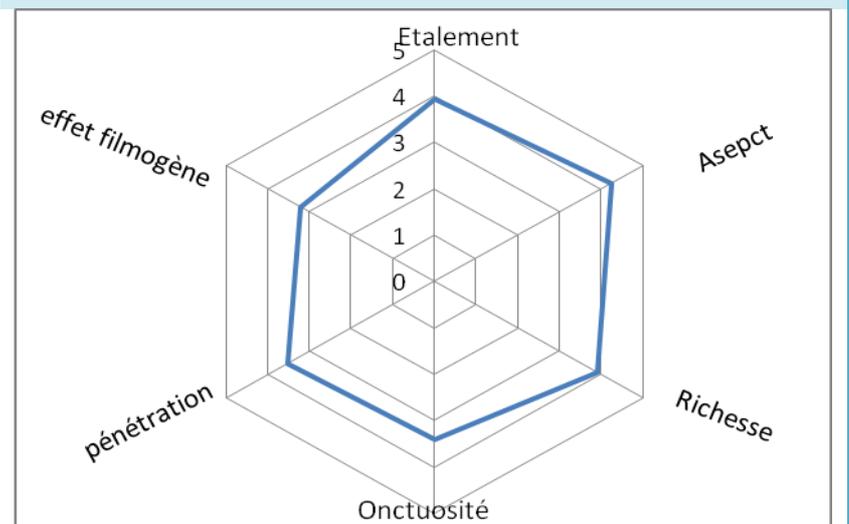
Essai

Diagramme

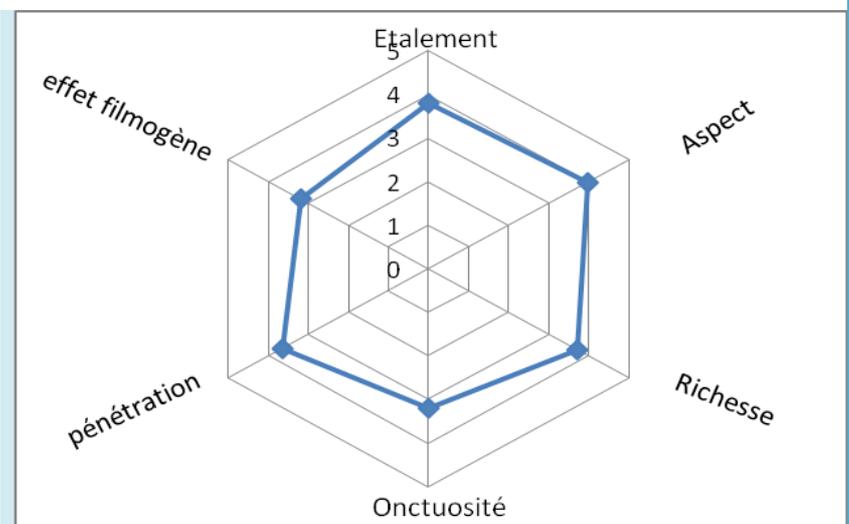
Essai N° 04  
(50/50) (PA=0.25%)



Essai N° 04  
(50/50)  
(PA=0.5%)

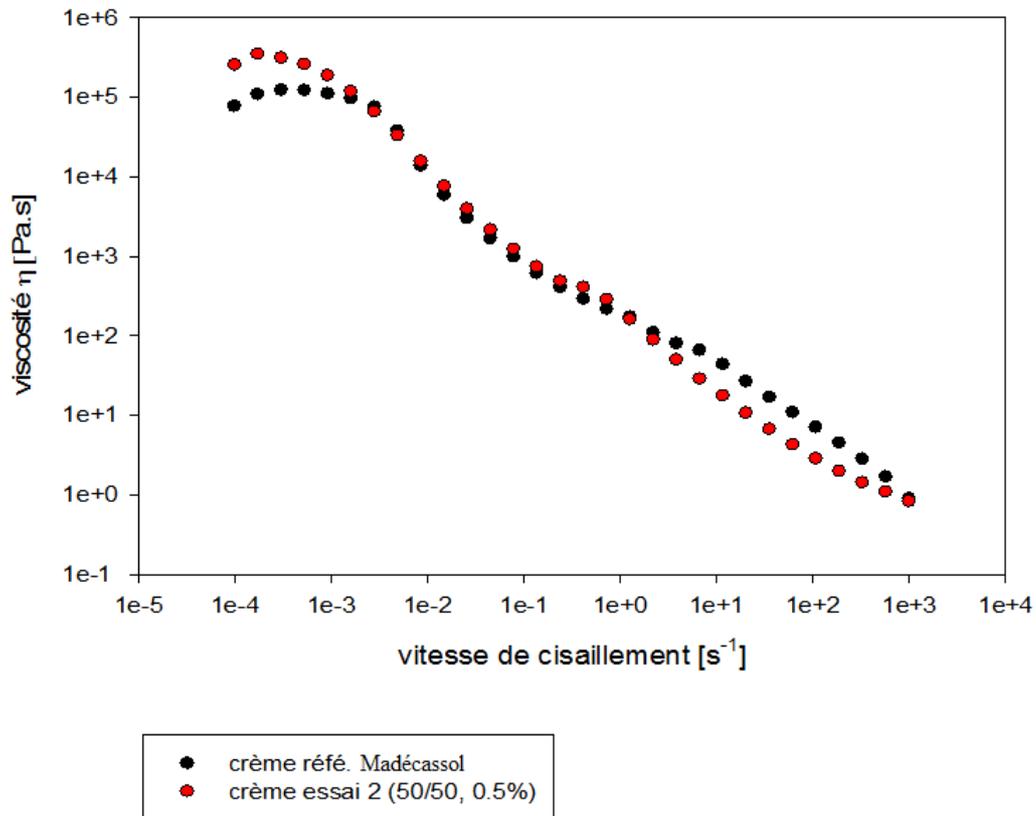


Essai N° 01  
(55/45)  
(PA=0.5%)



D'après les diagrammes obtenus par l'analyse sensorielle, la crème la plus appréciée par les 20 personnes pris comme échantillon de la population a été celle de l'essai 04 du rapport 50/50 avec une concentration de principe actif de 0.5%.

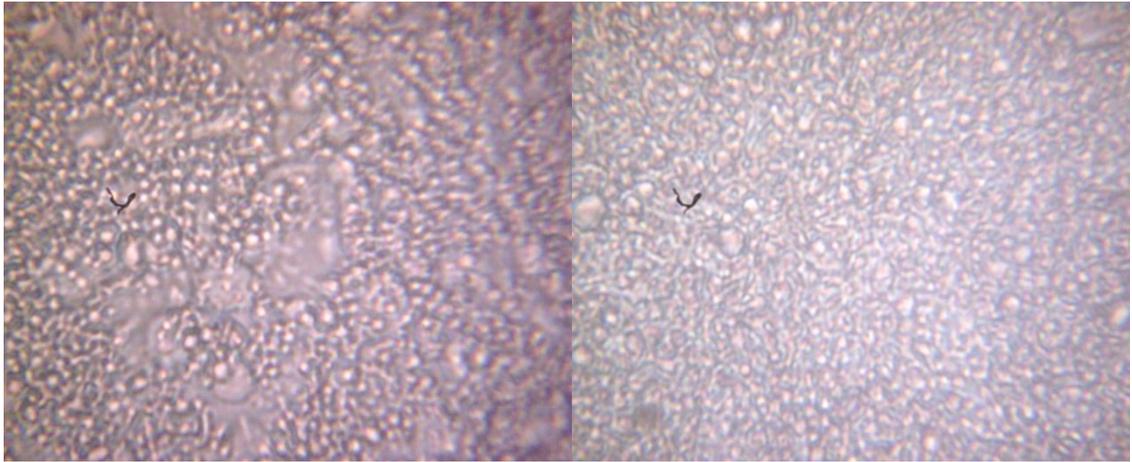
En plus l'analyse rhéologie de celle-ci se rapproche de la référence, donc elle a été choisie comme optimum de nos essais (voir Figure III.9).



**Figure III.9:** Courbes d'écoulement de la crème de référence et de l'optimum.

### 5. Contrôle de l'homogénéité par microscopie optique

L'image microscopique de la crème optimum formulé et la crème de référence sont présentés sur la Figure III.10, contrairement à l'œil nu, où l'on pensait que la crème était un mélange homogène, au microscope on voit bien qu'une émulsion est un mélange hétérogène. La crème formulé présente une dispersion avec des gouttelettes sphériques de taille plus au moins homogène semblable à la crème de référence.



A : Crème thérapeutique BIO formulé

B : Crème de référence « Madécassol »

Figure III.10: Image microscopique montrant une émulsion H/E des 2 crèmes (Optimum « crème thérapeutique BIO » et référence) avec un agrandissement 100 x.

## CONCLUSION

L'extraction du chitosane nous a permis d'obtenir un produit de qualité ultra-pure avec une pureté de 95%, ce qui permet son utilisation dans le domaine biomédical et pharmaceutique comme un agent d'accélération de la cicatrisation, antibactérienne et antifongique.

Le chitosane a été incorporé dans une préparation en tant que principe actif pour formuler une crème thérapeutique BIO 100%. Une optimisation des paramètres de formulation ont été effectués nous a mené à obtenir des formulations stables.

Une série de tests rhéologique, physico-chimique et sensorielle ont été effectués afin de pouvoir sélectionner la formulation (CA 5%, BK 2%, HAD 43%, Chitosane 0.5% et TA 0,5%) avec un rapport phase huile/ phase aqueuse = 1 comme étant celle qui présente les meilleurs critères.

Une étude comparative effectuée sur notre crème bio formulé au laboratoire avec des crèmes références « zêta, mycoster, madécassol» a montré que les paramètres physicochimique et rhéologique sont semblables.

Ayant obtenu ces résultats, une crème contenant des composants 100% Bio comparable à des crèmes conventionnelles, on peut dire que notre objectif est atteint. Au grand bonheur du chercheur, du formulateur et de l'utilisateur, la qualité d'une crème BIO est supérieure et ne peut être que meilleur, car tous les composants de cette crème contiennent des principes actifs naturels.



## LISTE DES ABREVIATIONS

- BIO : biologique
- FTIR : spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier.
- MEB: microscopie électronique à balayage.
- DRX: diffraction rayon X.
- RMN: Résonance magnétique nucléaire.
- HLB: Hydrophile lipophile balance (balance hydrophile lipophile).
- SEC : chromatographie d'exclusion stérique
- EPP : extrait de pépin de paplemensse.
- SEC: chromatographie d'exclusion stérique .
- UV: U Visible.
- P: population.
- pH : Potentiel hydrogène.
- DDA: degrés de désacétylation.
- MM/ masse molaire
- DA : degrés de Acétylation
- $\phi$ A: Phase aqueuse.
- $\phi$ H: Phase huileuse.
- H/E: Huile / Eau.
- E/H: Eau / Huile.
- h/E/H : huile/ eau/huile
- e/H/E : eau/huile/Eau
- MH : gélosé Mueller-Hinton
- EBT : Brunauer-Emmett-Teller
- CA : Cire d'abeille
- BK : beurre de karité
- HAD: Huile d'amande douce.
- TA: Tensioactif.
- CH: chitosane
- PA :Principe Actif
- Mt: Marins tonnes.
- Kg/hab. : kilogramme par habitent.

- T : tonnes
- ADN : acide désoxyribonucléique
- ARN : acide ribonucléique
- $\eta$  : Viscosité [Pa.s].
- $\dot{\gamma}$  : Vitesse de cisaillement [ $S^{-1}$ ].
- $\eta_0$  Viscosité à  $\dot{\gamma} \rightarrow 0$  [Pa.s] (à vitesse de cisaillement nul).
- $\eta_\infty$  Viscosité à  $\dot{\gamma} \rightarrow \infty$  [Pa.s] (à l'état infinie).
- $\tau$ : Contrainte de cisaillement [Pa].
- $\tau_c$ : Contrainte seuil ou critique [Pa].
- $K$  : Constante de Cross et de Carreau.
- $P$  : Exposant de Cross
- $R^2$  : Coefficient de corrélation

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] The state of world fisheries and aquaculture. In. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2010: p 218.
- [2] la situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Rapport de FAO 2009.
- [3] GLOBEFISH: Shrimp - August 2011, [<http://www.globefish.org/shrimp-august-2011.html>].
- [4] Wang S-L, Liang T-W, Yen Y-H: Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. *Carbohydr Polym*, 2011: p ( 732-742).
- [5] Monfort-Windels F: La chitine, matériau de demain. CRIF-WTMC; 2004: p 2
- [6] GIA: CHITINE ET CHITOSAN. Un Rapport De Gestion Stratégique Global. Global Industry Analysts; MCP-2039, 2010: p 230.
- [7] Kurita K: Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar Biotechnol*, 2006 : p (203-226)
- [8] Tharanathan R.N, Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*. 2003: p (71-78).
- [9] Muzzarelli R.A.A. euniaux C. and Gooday G.W. *Chitin in Nature and Technology*. New York: Plenum Publishing Corporation, 1986.
- [10] Roberts GAF, Structure of chitin and chitosan. In: *Chitin Chemistry*, Macmillan, and London, 1992: p (1-53).
- [11] Tolaimate. A, Desbrieres. J, Rhazi. M, Alagui. A, Contribution to the preparation of chitins and chitosans whith controlled physico-chemical property. *polym*, 2003: p (7939-7952).
- [12] R. Vieira, E. Guibal, E.A. Silva and M. Beppu, Adsorption and desorption of binary mixtures of copper and mercury ions on natural and crosslinked chitosan membranes, *Adsorption*, 2007: p (603–611).
- [13] Baldwin E.A, Nisperos-carriedo M.O, and Baker R.A, Use of edible coating to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Food Science and Nutrition*, 1995: p (509-523).
- [14] Caroline. C, Rachel. A et Marguerite. R, Synthèse et étude d'hydrogels thermosensibles obtenus par modification chimique contrôlée du chitosane. *L'actualité chimique* N° 294– février, 2006.

- [15] Nugraha .E, Développement de films biodégradables a base de chitosane: Etudes du mélange chitosane/PLA, de la plastification et de la compatibilisation. Thèse de doctorat, Université de Reims, juin 2006.
- [16] Desbrières. J, Chitin and chitosan. Chitine et chitosane. 2002: p (39-44).
- [17] Onsoyen. E and Skaugrud. O, Metal recovery using chitosan. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 1990: p (395-404).
- [18] Rinaudo. M, Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science (Oxford). 2006: p (603-632).
- [19] Norsker. M, Jensen. M and Adler-Nissen. J, Enzymatic gelation of sugar beet pectin in food products. Food Hydrocolloids. 2000: p (237-243).
- [20] Aye K.N, Karuppuswamy. R, Ahamed. T and Stevens. W.F, Peripheral enzymatic deacetylation of chitin and reprecipitated chitin particles. Bioresource Technology. 2006: p (577- 582).
- [21] Pa J.H. and Yu T.L. Light scattering study of chitosan in acetic acid aqueous solutions. Macromolecular Chemistry and Physics. 2001: p (985-991).
- [22] Brugnerotto. J, Lizardi. J, Goycoolea F.M, Argaelles-Monal. W, Desbriares. J and Rinaudo. M An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. Polymer. 2001: p (3569-3580).
- [23] Kasaai. M.R, Arul. J, Chin. S.L and Charlet. G, The use of intense femtosecond laser pulses for the fragmentation of chitosan. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 1999: p (201-205).
- [24] Heux. L, Brugnerotto. J, Desbriares. J, Versali. M.F and Rinaudo. M Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. Biomacromolecules. 2000: p (746-751).
- [25] Lou M.M, Zhu. B, Muhammad. I, Li. B, Xie. G.L, Wang. Y.L, Li H.Y and Sun G.C. Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen Burkholderia seminalis. Carbohydrate Research. 2011: p (1294-1301).
- [26] Yun Yang .B and Montgomery R. Degree of acetylation of heteropolysaccharides. Carbohydrate Research. 1999: p (156-162).
- [27] Nystrom. B, Kjaniksen. A.L and Iversen. C, Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity. Advances in Colloid and Interface Science. 1999: p (81-103).

- [28] Thanou. M and Junginger. H, Pharmaceutical applications of chitosan and derivatives in: Polysaccharide, Structural diversity and functional versatility New York: Marcel Dekker 2ed. 2005: p (661-670).
- [29] Grabovac. V, Gugli. D and Bernkop-Schnurch. A, Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005: p (1713- 1723).
- [30] Sorlier. P, Denuziere. A, Viton. C and Domard. A, Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecules*. 2001: p (765-772).
- [31] Shepherd. R, Reader. S and Falshaw. A, Chitosan functional properties. *Glycoconjugate Journal*. 1997: p (535-542).
- [32] Vazquez-Duhalt. R, Tinoco. R, D'Antonio. P, Topoleski L.D.T and Payne G.F, Enzyme conjugation to the polysaccharide chitosan: Smart biocatalysts and biocatalytic hydrogels. *Bioconjugate Chemistry*. 2001: p (301-306).
- [33] Ueno H, Mori. T and Fujinaga. T, Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001: p (105-115).
- [34] Varum K.M, Myhr M.M, Hjerde R.J.N and Smidsrad. O, In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydrate Research*. 1997: p (99- 101).
- [35] Onishi. H and Machida. Y, Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials*. 1999: p (175-182).
- [36] Ratajska. M and Boryniec. S, Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers. *Reactive and Functional Polymers*. 1998: p (35-49).
- [37] Kurita. K, Kaji. Y, Mori. T and Nishiyama. Y, Enzymatic degradation of chitin: Susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*. 2000: p (19-21).
- [38] Tomihata. K and Ikada. Y In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials*. 1997: p (567-575).
- [39] Chatelet. C, Damour. O and Domard. A, Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. 2001: p (261-268).
- [40] Denuziere. A, Ferrier. D, Damour. O and Domard. A, Chitosan – chondroitin sulfate and chitosan - hyaluronate polyelectrolyte complexes: Biological properties. *Biomaterials*. 1998: p (1275-1285).

- [41] Lahiji. A, Sohrabi. A, Hungerford D.S and Frondoza C.G, Chitosan support the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000: p (586-595).
- [42] Shi C., Zhu Y., Ran X., Wang M., Su Y. and Cheng T. Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine. *Journal of Surgical Research*. 2006: p (185-192).
- [43] Bacon. A, Makin. J, Sizer P.J, Jabbal-Gill. I, Hinchcliffe. M, Illum. L, Chatfield. S and Roberts M. Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. *Infection and Immunity*. 2000: p (5764-5770).
- [44] Muzzarelli R.A.A, Muzzarelli. C, Tarsi. R, Miliani. M, Gabbanelli. F and Cartolari. M. Fungistatic activity of modified chitosans against *Saprolegnia parasitica* *Biomacromolecules*. 2001: p (165-169). Nagaoka S., Takiuchi H., Yokot
- [45] Devlieghere. F, Vermeulen. A and J. Debevere Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*. (2004) (21): p (703-714).
- [46] Liu X.F, Guan Y.L, Yang D.Z, Li. Z and Yao K.D, Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*. 2001: p (1324-1335).
- [47] Peng. L, Wang. B and P. Ren Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. (2005a) (45): p (108-111).
- [48] Helander I.M, Nurmiäho-Lassila E.L, Ahvenainen. R, Rhoades. J and Roller S. Chitosan disrupt the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. (2001) (71): p (235-244).
- [49] Laflamme. P, Benhamou. N, Bussiares. G and Dessureault. M Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Canadian Journal of Botany*. 1999: p (1460-1468).
- [50] Roller. S and Covill. N The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*. (1999) (47): p (67-77).
- [51] Choi B.K, Kim K.Y, Yoo Y.J, Oh S.J, Choi J.H and Kim C.Y In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. (2001) (18): p (553-557).

- [52] Li. Y, Chen X.G, Liu N, Liu C.S, Liu C.G, Meng X.H, Yu L.J and Kenendy J.F Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. *Carbohydrate Polymers*. 2007: p (227-232).
- [53] Zhong. Z, Xing. R, Liu. S, Wang. L, Cai. S and Li. P, Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro. *Carbohydrate Research*. 2008: p (566-570).
- [54] Coma. V, Deschamps. A and Martial-Gros. A, Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan Polymer - Antimicrobial Activity Assessment on Dairy-Related Contaminants. *Journal of Food Science*. 2003: p (2788-2792).
- [55] Rabea E.I, Badawy M.E.T, Stevens C.V, Smagghe. G and Steurbaut. W, Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003: p (1457-1465).
- [56] Cuero R.G, Osuji. G and Washington. A, N-Carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc. *Biotechnology Letters*. 1991: p (441-444).
- [57] El Ghaouth. A, Arul. J, Asselin. A and Benhamou. N, Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycological Research*. 1992: p (769-779).
- [58] Howling. GI, Dettmar. PW, Goddard. PA, Hampson. FC, Dornish. M and Wood EJ: The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*, 2001, 22(22): p (2959-2966).
- [59] Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, Baptista P, Henriques J, Ferreira C, Silva JC, Borges JP, and Pires. E, Chaves P et al: Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair Regen*, 2009, 17(6): p (817-824).
- [60] Y.Okamoto, K.Shibazaki, S.Minami, A.Matsihashi, S.Tanioka, and Y.shigemasa, Evaluation of chitin and chitosan on open wound-Healing in Dogs, *journal of veterinary medical science*, (1995) (57): p (851-854).
- [61] T.Kosaka, Y.Kaneko, Y.Nakada, M.Matsuura and S.Tanaka , effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress, *journal of veterinary medical science*, 58(1996): p(963-967).
- [62] H.Ueno, H.Yamada, I.Tanaka, N.Kaba, M.Matsuura, M.Okumura, T.Kadosawa, and T.Fujinaga, Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs, *biomaterials*, 20 (1991): p(1407-1414).
- [63] Chirkov S.N. The antiviral activity of chitosan (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2002: p 38, (1-8).

- [64] Liu W.G. and De Yao K. Chitosan and its derivatives - a promising non-viral vector for gene transfection. *Journal of Controlled Release*. 2002: p (1-11).
- [65] Kochkina Z.M. and Chirkov S.N. Influence of chitosan derivatives on the development of phage infection in the *Bacillus thuringiensis* culture. *Microbiology*. 2000: p (217- 219).
- [66] Schipper N.G.M, Olsson S, Hoogstraate J.A, deBoer A.G, Varum K.M. and Artursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs .2. Mechanism of absorption enhancement. *Pharmaceutical Research*. 1997: p (923-929).
- [67] Sajomsang. W, Tantayanon. S, Tangpasuthadol. V and Daly W.H, Synthesis of methylated chitosan containing aromatic moieties: Chemo selectivity and effect on molecular weight. *Carbohydrate Polymers*. 2008: p (740-750).
- [68] Qin C.Q, Du .Y.M, Xiao. L, Li. Z and Gao X.H, Enzymic preparation of watersoluble chitosan and their antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2002: p (111-117).
- [69] Vinsova J. and Vavrikova E. Chitosan Derivatives with Antimicrobial, Antitumour and Antioxidant Activities - a Review. *Current Pharmaceutical Design*. 2011: p (3596-3607).
- [70] Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, Mikami T, Suzuki S and M S. Growthinhibitory effect of hexa-N acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1988: p (784–790).
- [71] Pasanphan. W, Buettner G.R. and Chirachanchai. S, Chitosan gallate as a novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study. *Carbohydrate Research*. 2010: p (132-140).
- [72] Kim S.K. and Rajapakse N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*. 2005: p (357-368).
- [73] Prabakaran M. and Mano J.F, Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. *Drug Delivery*. (2005).(12), p: 41-57.
- [74] Crini G. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresource Technology*. (2006) (97): p (1061-1085).
- [75] Florence Dupasquier. Hydrogels physiques de chitosane pour la regeneration in vivo du tissu cutané après brulures du troisième degré. *Médecine humaine et pathologie*. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. P : 9.
- [76] Kanitakis, J, Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*, 2002. 12(4): p (390-401).

- [77] Dubois J, Demelin M. La peau : de la santé à la beauté - notions de dermatologie et de dermocosmétologie. Toulouse: Privat (2007) p: 208.
- [78] Singh S, Singh J, Transdermal drug delivery by passive diffusion and iontophoresis: a review. *Med Res Rev*, (1993) 13: p (569–621).
- [79] Melissopoulos A, Levacher Ch, La peau : structure et physiologie. Tec & Doc Lavoisier; Editions Médicales internationales, 1998.
- [80] Cross SE, Roberts MS. Effects of dermal blood flow, lymphatics and binding as determinants of topical absorption, clearance and distribution. In: *Dermal absorption models in toxicology and pharmacology*. Ed. Riviere JE. Taylor Francis, (2005): p (249–279).
- [81] Park H, Copeland C, Henry S, Barbul A. Complex wounds and their management. *Surg Clin North Am*. 2010; p: (90, 94-1181).
- [82] Marie FOIT, la cicatrisation favorisée par les huiles essentielles. Novembre 2013, p :(5-8).
- [83] Li, W., Dasgeb, B., Phillips, T., Li, Y., Chen, M., Garner, W et Woodley, D. T., Woundhealing perspectives. *Dermatol Clin*, 2005. 23 (2): p (181-192).
- [84] Smith, K. L et Dean, S. J, Tissue repair of the epidermis and dermis. *J Hand Ther*, 1998: p (95-104).
- [85] Dominique P, Pharmacologie. (Éd.), Vuibert. 2002: P (11, 21-22, 38, 40, 96-102).
- [86] Moulin M, Coquerel A. Pharmacologie. 2<sup>ème</sup> édition. Masson. 2002. P: 50.
- [87] AIACHE J.M, AIACHE S et RENOUX R, Initiation à la connaissance des médicaments, Masson, Paris, 1995 ,2e édition, p.24.
- [88] Le Hir A. Pharmacie galénique. 8 ème édition. Masson. 2001. p (2, 4, 6, 36,96).
- [89] Kassa D, Benouniche N., Denine R, Ouali A. Cours de pharmacologie n° 1. (Éd.).OPU. 1986. P: 4-39.
- [90] Ashak K., Mahesh.V. Ch. Excipient developpent for pharmaceutical. *Biotechnology and drug Delivery systems*. (ed.). Neuromolecular Pharmaceutical, Inc, Emeryville, California, USA. 2006. P: 1.
- [91] Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. (2005) 10: p (102-110).
- [92] Brochette P, Emulsification : Elaboration et étude des émulsions. *Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés* (1999) J2150 : 1-18

- [93] Smith EW, Maibach HI, Surber C, Nielloud F, Marti-Mestres G, Use of emulsions as topical drug delivery systems en *Pharmaceutical Emulsions and suspensions* ; éd, (2000) Chapter 7, p. 259-270, Marcel Dekker, NewYork.
- [94] LACHARME, F, Les produits cosmétiques biologique : labels, composition et analyse critique de quelques formules, thèse doctorat, de l'université de JOSEPH FOURIER, 2004.
- [95] HAMPIKIAN S, Créez vos cosmétiques BIO, Terre vivante, Mens : « D'autres actifs indispensables », 2007 : p (75-96).
- [96] Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*, 1957, 226 (1):497-509.
- [97] W.S.W.Ngah and S. Fatinathan: adsorption of cu (II) ions in aqueous solution using chitosan beads, chitosan- GLA beads and chitosan-alginate beads. *Chemical engineering journal*, (2008). 143, 62, 72.
- [98] F.G.Pearson; infrared spectra of crystalline polysaccharides. V. chitin. *Polymer chemistry*, (1960) 43, (141):101-116.
- [99] Islem younes, Olfaghorbel –Bellaaja, rim Nasira, Moncef Chaabounib, Marguerite Rinaudoc, d, Mocef Nasira. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization.process *biochemistry*, (2012) 47 ,2032-2039
- [100] Renata Czechowska-Biskup, Diana Jarosinska, Bozena Rokita, Piotrulanski, Janusz M. Rosiak. Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparision of methods. *Progress on chemistry and application of chitin and*, XVII, (2012). P: (5-20).
- [101] Duval M. et Olivier F. Isolation et valorisation des constituants de la carapace de la crevette blanche. Mémoire de maîtres sciences (M.sc.). Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'alimentation. Université LAVAL Québec. 2008.
- [102] Focher B, Beltrame PL, Naggi A, Torri G: Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications. *Carbohydr Polym*, 1990, 12(4): p (405-418).
- [103] Y.W.Ch., J. Jang, C.R. Park et S.W.Ko. Preparation and solubility in acid and water of partially Deacetylated chitins, *Biomacromolecules*. 2000, p; (1,609-614)

## ANNEXE I

**Tableau : Résultat de titrage potentiométrique**

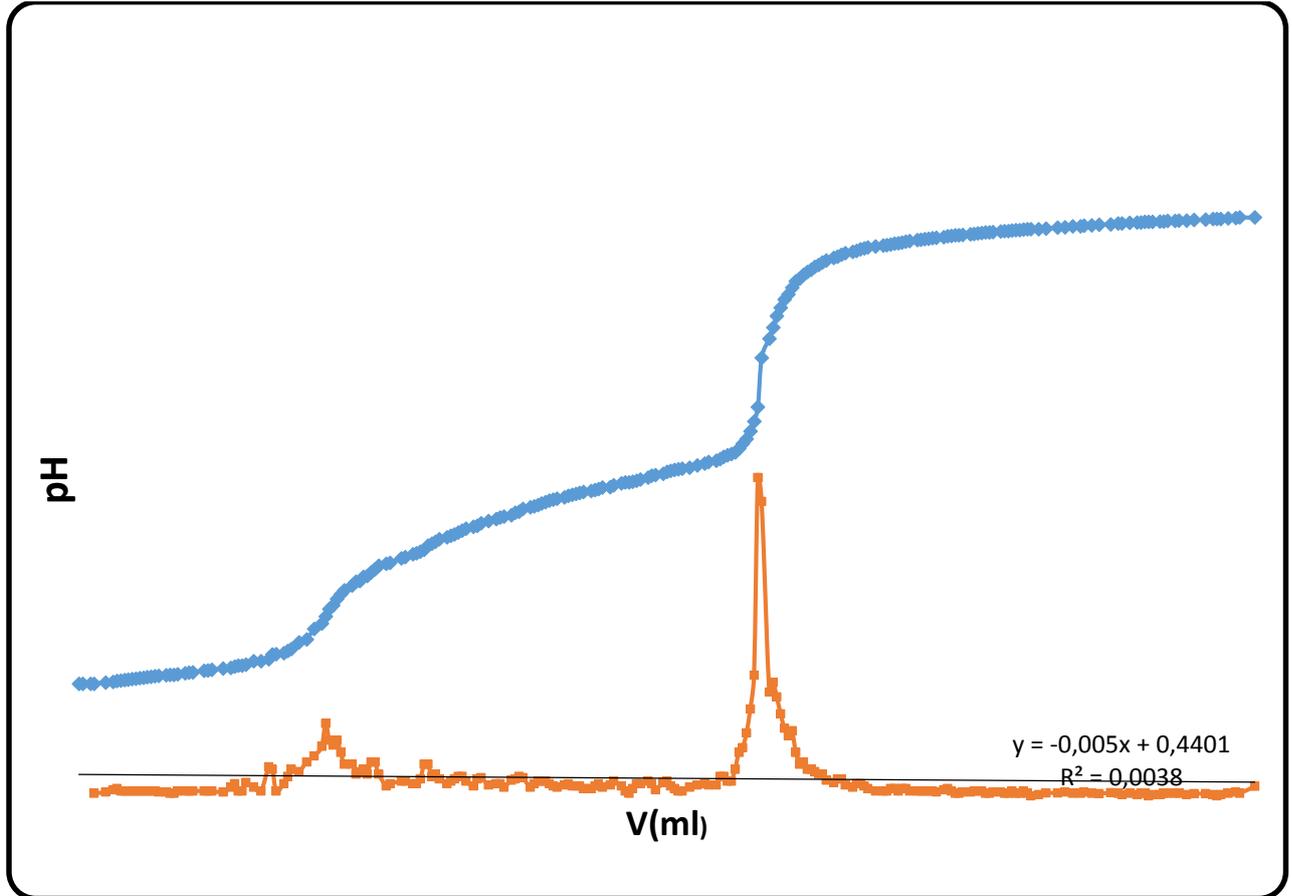
V(ml)	0	0.1	0.3	0.4	0.7	0.9	1	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5
pH	2.32	2.32	2.32	2.32	2.35	2.36	2.38	2.39	2.4	2.41	2.42	2.43
V(ml)	1.6	1.7	1.8	1.9	2	2.1	2.3	2.4	2.5	2.6	2.8	2.9
pH	2.44	2.45	2.46	2.47	2.48	2.49	2.50	2.51	2.51	2.52	2.54	2.55
V(ml)	3	3.3	3.4	3.5	3.8	4	4.1	4.2	4.3	4.4	4.6	4.8
pH	2.56	2.59	2.60	2.61	2.64	2.65	2.68	2.70	2.70	2.72	2.79	2.79
V(ml)	5	5.1	5.2	5.4	5.5	5.6	5.8	6	6.2	6.4	6.5	6.6
pH	2.83	2.93	2.94	2.96	3	3.04	3.18	3.24	3.46	3.57	3.72	3.83
V(ml)	6.7	6.8	6.9	7	7.2	7.3	7.4	7.5	7.6	7.7	7.8	7.9
pH	3.95	4.08	4.18	4.26	4.36	4.44	4.45	4.54	4.56	4.63	4.70	4.77
V(ml)	8.1	8.2	8.5	8.6	8.8	8.9	9	9.1	9.2	9.3	9.4	9.5
pH	4.81	4.83	4.92	4.95	5.01	5.03	5.06	5.1	5.19	5.23	5.27	5.32
V(ml)	9.7	9.8	9.9	10	10.1	10.2	10.4	10.5	10.6	10.8	11	11.1
pH	5.36	5.39	5.42	5.46	5.5	5.54	5.58	5.60	5.65	5.70	5.74	5.77
V(ml)	11.2	11.4	11.5	11.6	11.7	11.9	12	12.1	12.2	12.3	12.4	12.5
pH	5.79	5.82	5.87	5.89	5.95	5.98	6	6.03	6.06	6.09	6.12	6.14
V(ml)	12.6	12.8	12.9	13	13.1	13.2	13.3	13.5	13.6	13.7	13.8	14
pH	6.16	6.19	6.22	6.24	6.26	6.28	6.30	6.32	6.34	6.36	6.39	6.40
V(ml)	14.1	14.3	14.4	14.5	14.6	14.7	14.8	15	15.1	15.2	15.4	15.5
pH	6.44	6.48	6.50	6.50	6.51	6.53	6.56	6.60	6.64	6.65	6.68	6.72
V(ml)	15.6	15.7	15.8	15.9	16.1	16.3	16.5	16.6	16.8	16.9	17	17.1
pH	6.74	6.76	6.77	6.78	6.80	6.85	6.89	6.92	6.95	6.98	7.03	7.06
V(ml)	17.2	17.3	17.4	17.5	17.6	17.7	17.8	17.9	18	18.2	18.3	18.4
pH	7.09	7.12	7.20	7.30	7.40	7.56	7.76	8.06	9.08	9.48	9.71	9.95
V(ml)	18.5	18.6	18.7	18.8	18.9	19	19.1	19.2	19.3	19.4	19.5	19.6
pH	10.12	10.29	10.40	10.54	10.67	10.72	10.8	10.86	10.91	10.97	11.01	11.06
V(ml)	19.7	19.9	20	20.1	20.2	20.4	20.5	20.6	20.7	20.8	21	21.2
pH	11.1	11.15	11.18	11.22	11.25	11.28	11.30	11.33	11.35	11.37	11.39	11.41
V(ml)	21.3	21.4	21.5	21.6	21.7	21.8	21.9	22.1	22.2	22.3	22.4	22.5
pH	11.42	11.43	11.45	11.46	11.47	11.49	11.50	11.52	11.53	11.54	11.55	11.56
V(ml)	22.6	22.8	22.9	23	23.1	23.2	23.3	23.5	23.6	23.7	23.8	23.9
pH	11.57	11.58	11.60	11.61	11.62	11.62	11.63	11.64	11.65	11.66	11.67	11.68
V(ml)	24	24.1	24.3	24.4	24.5	24.6	24.7	24.8	24.9	25	25.1	25.3
pH	11.68	11.69	11.70	11.71	11.71	11.72	11.73	11.73	11.74	11.75	11.75	11.75

V(ml)	25.5	25.8	26	26.2	26.4	26.5	26.7	26.9	27.2	27.4	27.5	27.7
pH	11.76	11.78	11.79	11.81	11.81	11.82	11.83	11.84	11.85	11.87	11.87	11.88

V(ml)	27.9	28	28.1	28.2	28.3	28.5	28.6	28.7	28.9	29	29.2	29.4
pH	11.89	11.89	11.90	11.90	11.90	11.91	11.91	11.92	11.92	11.93	11.93	11.94

V(ml)	29.7	29.9	30	30.1	30.3	30.5	30.6	31
pH	11.95	11.96	11.96	11.96	11.97	11.98	11.99	11.99

**Figure : Corurbe titrage potentiométrique :**

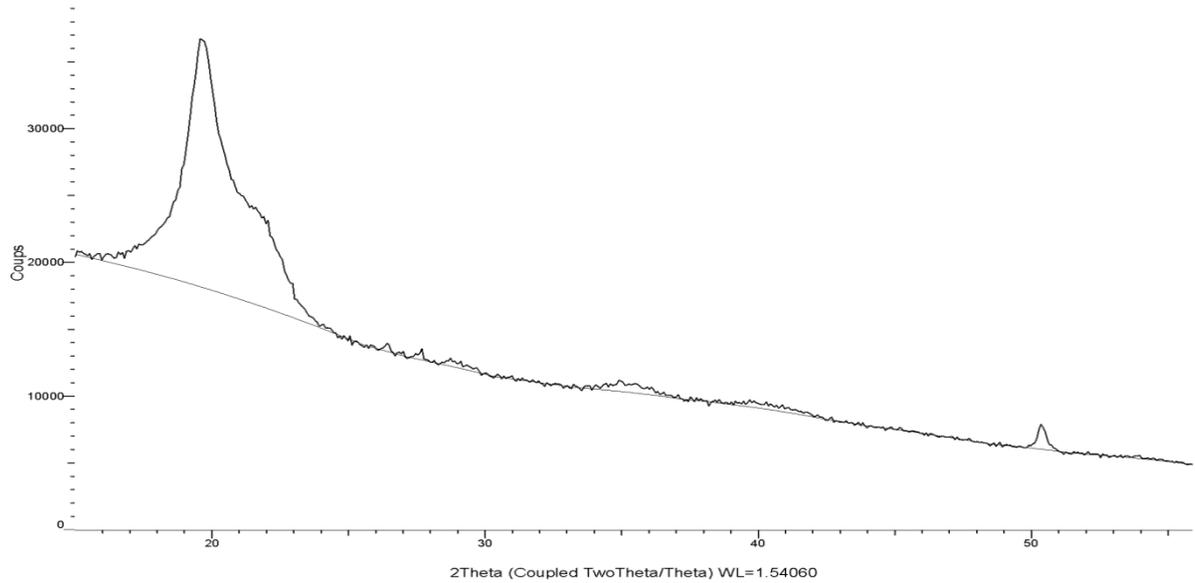


## ANNEXE II

### Résultat du diffraction rayon X du chitosane:

#### ➤ Chitosane commerciale :

Commander Sample ID (Coupled TwoTheta/Theta)



#### ➤ Chitosane extrait

Commander Sample ID (Coupled TwoTheta/Theta)

