

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université de Saad Dahleb Blida -1-**  
**Faculté De Technologie**  
**Département de Génie des Procédés**



**Mémoire**

En vue de l'obtention du diplôme de  
**MASTER PROFESIONEL EN GENIE DES PROCEDES**  
**Spécialité : Pharmacie Industrielle**

Intitulé du mémoire

APPLICATION THERAPEUTIQUE D'UN BIOPOLYMER :  
ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DU CHITOSANE SUR LA  
RECTOCOLITE ULCERO-HEMORRAGIQUE

**Présenté par :**

LAICHI YASMINE

**Encadré par :** Mme Laribi

**Co-Encadré par :** Mme Belkadi

Année universitaire 2018/2019

## **Remerciement**

*Tout d'abord, Nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné le savoir et l'opportunité de pouvoir poursuivre nos études et de choisir un métier aussi noble.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma promotrice **Mme Laribi** pour son encadrement de qualité, son orientation, sa disponibilité et pour la confiance qu'elle m'a accordé. Je lui ai très reconnaissante d'avoir mis toute sa compétence à ma disposition, pour ses conseils judicieux, sa patience et son suivi régulier à l'élaboration de ce travail.*

*Je remercie aussi l'équipe du **CRD –Saidal de Gué de Constantine** à sa tête **Mme Belkadi** pour son aide précieux et ses conseils. Ainsi que l'équipe de recherche et développement du **Laboratoire BEKER –Dar El Beidha** pour leur fourniture du matériel et leur assistance.*

*J'adresse mes plus sincères remerciements au personnel du laboratoire d'Histopathologie **CHU de Douera** spécialement **Dr Belogbane**, je les remercie de m'avoir fait bénéficier de leurs conseils et de leurs avis éclairés.*

*A tous les enseignants qui m'ont formé tout au long de mon parcours universitaire.*

*Un grand merci à tous.*



## Dédicace

*A ma mère chérie, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que tu as consenti pour mon instruction et mon bien être.*

*Je te remercie pour tout le soutien et l'amour que tu me portes depuis mon enfance et j'espère que ta bénédiction m'accompagne toujours.*

*A mon cher père, qui a su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances au cours de toutes mes années d'études.*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitte jamais assez.*

*Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.*

*A mon fiancé, mon ami fidèle et mon tout qui ma encourager et soutenu tout au long de ce mémoire et qui a partagé avec moi chaque moment de joie et de chagrin. Un grand merci que de dieu te garde a moi pour toujours.*

*A mon meilleur ami Zoheir et mon conseiller, qui m'a assisté dans les moments difficiles et m'a soutenu pour traverser des épreuves pénibles .... Je te suis très reconnaissante, et je ne te remercierai jamais assez pour ton amabilité, ta générosité, ton aide précieuse.*

*A mes meilleures Hiba , Nadjet , Nacera ,khadidja, Lamia merci d'être à mes côtés et pour votre soutien éternel.*

*A ma famille qui m'a comblé d'amour, de tendresse et d'affection je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protégé et vous garde.*

*A mes amies, amis et toute la promo PHI, vous étiez une véritable famille pendant tout le cursus, 4 ans de joie de bonheur et de bons moments. Merci à vous tous.*

*Yasmine*



# La table des matières

<b>LA TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DE LA NOMENCLATURE .....</b>	<b>VII</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>3</b>
I.1 LES BIOPOLYMERES.....	3
<i>I.1.1 Définitions .....</i>	<i>3</i>
<i>I.1.2 Différents types de bio- polymères .....</i>	<i>3</i>
I.1.2.1 Biopolymères issus de la Biomasse .....	3
I.1.2.2 Biopolymères produits par polymérisation chimique .....	5
<i>I.1.3 Chitosane.....</i>	<i>6</i>
I.1.3.1 Généralité sur le Chitosane.....	6
I.1.3.2 Production du Chitosane .....	7
I.1.3.3 Propriétés du Chitosane.....	9
I.1.3.4 Applications médicales du Chitosane .....	11
I.1.3.5 Les différentes activités biologiques du Chitosane .....	11
I.1.3.6 Définition de l'inflammation.....	13
I.1.3.7 Les différentes formes de l'inflammation .....	13
I.1.3.8 Les anti-inflammatoire .....	14
I.1.3.9 Les maladies inflammatoires de l'intestin.....	15
I.1.3.10 L'anatomie du colon.....	15
I.1.3.11 Microbiote intestinal .....	16
I.1.3.12 La RCUH.....	17
I.1.3.13 Les différents model de l'induction d'une inflammation intestinale .....	21
I.2 L'ENCAPSULATION.....	22
<i>I.2.1 La forme pharmaceutique solide (forme sèche).....</i>	<i>22</i>
<i>I.2.2 Les capsules.....</i>	<i>22</i>
<i>I.2.3 L'avantage des capsules.....</i>	<i>23</i>

I.2.4	<i>Inconvénients des capsules</i> .....	23
I.2.5	<i>Types de capsules</i> .....	23
I.2.5.1	Capsules à enveloppe molle .....	23
I.2.5.2	Capsule a enveloppe dure.....	24
<b>CHAPITRE II:PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>		<b>31</b>
II.1	PRODUITS ET ANIMAUX .....	31
II.1.1	<i>Biopolymère (Chitosane)</i> .....	31
II.1.2	<i>Les gélules</i> .....	32
II.1.1	<i>Animaux</i> .....	32
II.2	APPAREILLAGE.....	33
II.3	METHODES .....	34
II.3.1	<i>Caractérisation Physico- chimique du Chitosane</i> .....	34
II.3.1.1	Degré d'acétylation .....	34
II.3.1.2	Analyse UV-VISIBLE .....	35
II.3.1.3	Poids Moléculaire.....	35
II.3.1.4	Détermination de la taille des particules par Diffraction dynamique de la lumière (DLS Dynamic Light Scattering en anglais).....	36
II.3.1.5	Potentiel Zeta.....	36
II.3.2	<i>Etude de l'activité anti-inflammatoire intestinale du Chitosane</i> .....	36
II.3.2.1	Préparation de la solution de Chitosane a gavée .....	36
II.3.2.1	Induction et traitement de la maladie .....	37
II.3.2.2	Evaluation de l'activité anti-inflammatoire intestinale du Chitosane .....	39
II.3.2.3	L'Analyse statistique.....	41
II.3.2.4	Observation microscopique (étude histologique).....	41
II.3.3	<i>Fabrication des gélules</i> .....	43
II.3.3.1	Méthode de Remplissage .....	43
II.3.3.2	Control qualité des capsules :.....	44
<b>CHAPITRE III:RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>		<b>49</b>
<b>RESULTATS .....</b>		<b>49</b>
III.1	CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DU CHITOSANE.....	49
III.1.1	<i>Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier</i> .....	49
III.1.2	<i>Degré D'acétylations</i> .....	50

III.1.3	<i>UV-VISIBLE</i> .....	50
III.1.4	<i>Le poids moléculaire</i> .....	51
III.1.5	<i>Mesure du potentiel Zeta</i> .....	52
III.1.6	<i>Détermination de la taille des particules par diffusion dynamique de la lumière (DLS)</i> .....	54
III.2	EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DU CHITOSANE .....	55
III.2.1	<i>Observation macroscopique</i> .....	55
III.2.2	<i>Evaluation macroscopique de l'effet doses du Chitosane sur la RCUH</i> .....	56
III.2.2.1	<i>Le pourcentage de viabilité</i> .....	56
III.2.2.2	<i>Indice d'activité de la maladie</i> .....	57
III.2.2.3	<i>Score macroscopique d'ulcération :</i> .....	57
III.2.2.4	<i>L'effet des différentes doses de Chitosane sur le poids et la longueur des colons</i> .....	61
III.3	OBSERVATION MICROSCOPIQUE (ETUDE HISTOLOGIQUE) .....	63
III.4	FABRICATION DES CAPSULES .....	68
III.5	CONTROL QUALITE DES CAPSULES .....	68
III.5.1	<i>Control de l'aspect</i> .....	68
III.5.2	<i>Identification du Principe actif</i> .....	68
III.5.3	<i>Poids moyen et uniformité de poids</i> .....	69
III.5.4	<i>Test de désintégration</i> .....	71
III.5.5	<i>Essai de dissolution</i> .....	71
	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>73</b>
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>80</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>I</b>
	<b>ANNEXES</b> .....	<b>II</b>

## Liste des figures

<b>FIGURE I-1:</b> CLASSIFICATION DES POLYMERES BIODEGRADABLES .....	3
<b>FIGURE I-2 :</b> LE PASSAGE DE LA CHITINE EN CHITOSANE PAR DESATELLISATION.....	8
<b>FIGURE I-3 :</b> METHODE DE PRODUCTION DE CHITOSANE .....	8
<b>FIGURE I-4 :</b> LES DIFFERENTS SEGMENTS DU COLON. ....	16
<b>FIGURE I-5 :</b> LES CAPSULES A ENVELOPPE MOLLE .....	24
<b>FIGURE I-6 :</b> LES CAPSULES CONI-SNAP.....	25
<b>FIGURE I-7 :</b> EXEMPLES SUR LES MATERIAUX DE REMPLISSAGES POSSIBLES DES CAPSULES.....	26
<b>FIGURE I-8 :</b> TAILLES ET FORMES DES CAPSULES DURES. ....	28
<b>FIGURE I-9 :</b> LES ETAPES DE FONCTIONNEMENT DE BASE DE TOUTES LES MACHINES DE REMPLISSAGE DE CAPSULES DURES. (LARRY L.AUGSBURGER, 2017).....	29
<b>FIGURE II-1 :</b> POUDRE DU CHITOSANE UTILISE, ISSU DES CARAPACES DE CREVETTES.....	31
<b>FIGURE II-2 :</b> FORMULE DEVELOPPE DU CHITOSANE.....	31
<b>FIGURE II-3:</b> PHOTO DES GELULES A BASE DE GELATINE DE TAILLE 0 PAR LABORATOIRE BEKER-DAR EL BEIDHA.....	32
<b>FIGURE II-4 :</b> PHOTO DES SOURIS ALBINOS (ANIMALERIE DE CRD SAIDAL, GUE DE CONSTANTINE 2019).....	33
<b>FIGURE II-5 :</b> PHOTO MONTRANT LA REPARTITION DES SOURIS EN 6 LOTS. ....	33
<b>FIGURE II-6 :</b> PHOTO DE L'APPAREIL DE DIFFRACTION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE NANOPARTICULES SZ-100 (HORIBA-SCIENTIFIC).....	36
<b>FIGURE II-7 :</b> PHOTO DE LA PREPARATION DE LA SOLUTION DE CHITOSANE POUR GAVAGE. ....	37
<b>FIGURE II-8:</b> PHOTO MONTRANT LA METHODE D'INDUCTION DES COLITES CHEZ LES SOURIS PAR L'ACIDE ACETIQUE A 5% PAR VOIE RECTALE .....	37
<b>FIGURE II-9:</b> PRESENTATION DE LA METHODE DU GAVAGE (ANIMALERIE - CRD GUE DE CONSTANTINE).....	38
<b>FIGURE II-10:</b> PHOTO ILLUSTRANT LA DISSECTION DES SOURIS APRES LES 6 JOURS DE TRAITEMENT.....	40
<b>FIGURE II-11 :</b> PHOTO DU DEPOT DE L'ECHANTILLON DANS DES HISTO-CASETTES ET LEUR FERMETURE. ....	42
<b>IGUREFII-12:</b> PHOTO DU DESINTEGRATEUR TOYAMA-LABORATOIRE BEKER-DAR EL BEIDHA .....	46
<b>FIGURE II-13:</b> PHOTO DU DISSOLU-TEST ERWIKA -UNIVERSITE DE BLIDA 1 .....	46

<b>FIGURE III-1 :</b> SPECTRE INFRAROUGE (IRTF) DU CHITOSANE. ....	49
<b>FIGURE III-2 :</b> SPECTRE UV-VISIBLE DETERMINANT LA BANDE D'ABSORPTION MAXIMAL DU CHITOSANE. ....	51
<b>FIGURE III-3 :</b> COURBE DE VISCOSITE REDUITE. ....	51
<b>FIGURE III-4 :</b> MESURE DU POTENTIEL ZETA DU CHITOSANE.....	52
<b>FIGURE III-5 :</b> ANALYSE PAR DLS DES PARTICULES DE CHITOSANE.....	54
<b>FIGURE III-6:</b> OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES DES DOMMAGES CAUSES PAR L'INDUCTION DE L'ACIDE ACETIQUE. ....	56
<b>FIGURE III-7:</b> POURCENTAGE DE VIABILITE DES SOURIS DES 6 LOTS PENDANT 6JOUR.....	56
<b>FIGURE III-8 :</b> SCORE CLINIQUE SELON (COOPER, ET AL., 1993). ....	57
<b>FIGURE III-9 :</b> OBSERVATIONS MACROSCOPIQUE DES COLONS RECUPERES, A): LOT TEMOIN ;B):LOT CONTROL NEGATIF ;C): LOT CONTROL POSITIF (DEXAMETHASONE) D):LOT CS 0.5G ;E):Lot /CS0.75G/ F):Lot CS 1G. ....	58
<b>FIGURE III-10 :</b> SCORE MACROSCOPIQUE D'ULCERATION. ....	59
<b>FIGURE III-11 :</b> RAPPORT POIDS /LONGUEURS DES COLONS RECUPERES.....	62
<b>FIGURE III-12 :</b> MICROPHOTOGRAPHIE DE LA SECTION HISTOLOGIQUE DU FRAGMENT DU COLON DES SOURIS DU LOT TEMOIN, A) G×10. B) G×40, C) G×100.....	64
<b>FIGURE III-13 :</b> MICROPHOTOGRAPHIE DE LA SECTION HISTOLOGIQUE DU FRAGMENT DU COLON DES SOURIS DU CONTROL NEGATIF. A) G ×10 B) G×40. C) G×100. ....	65
<b>FIGURE III-14 :</b> MICROPHOTOGRAPHIE DE LA SECTION HISTOLOGIQUE DU FRAGMENT DU COLON DES SOURIS DU CONTROL POSITIF (LOT TRAITE PAR LA DEXAMETHASONE). A) G ×10 B) G×40. C) G×100.. ....	65
<b>FIGURE III-15 :</b> MICROPHOTOGRAPHIE DE LA SECTION HISTOLOGIQUE DU FRAGMENT DU COLON DES SOURIS TRAITE AVEC 0.5G DE CHITOSANE, A) G ×10 B) G×40. C) G×100. ....	66
<b>FIGURE III-16 :</b> MICROPHOTOGRAPHIE DE LA SECTION HISTOLOGIQUE DU FRAGMENT DU COLON DES SOURIS TRAITES AVEC 0.75 G DE CHITOSANE. A) G ×10 B) G×40. C) G×100.....	67
<b>FIGURE III-17 :</b> MICROPHOTOGRAPHIE DE LA SECTION HISTOLOGIQUE DU FRAGMENT DU COLON DES SOURIS TRAITE AVEC 1G DE CHITOSANE, A) G ×10 B) G×40. C) G×100.....	67
<b>FIGURE III-18 :</b> PROFIL DE DISSOLUTION TYPIQUE DES ESSAIS DE DISSOLUTION AVEC .....	71

## Liste des tableaux

<b>TABLEAU I-1 : LES DIFFERENTES FORMES DE LA RCUH .....</b>	<b>18</b>
<b>TABLEAU I-2 : ÉTAPES IMPLIQUEES DANS LA PRODUCTION D'ENVELOPPE DE LA GELULE AVEC UNE BREVE DESCRIPTION .....</b>	<b>27</b>
<b>TABLEAU I-3 : DIFFERENTES TAILLES DE CAPSULES EN TERMES DE VOLUME D'EAU ET DE POIDS .....</b>	<b>28</b>
<b>TABLEAU II-1:COMPOSITION DE LA GELULE .....</b>	<b>32</b>
<b>TABLEAU II-2 : APPAREILS UTILISES EN EXPERIENCES. ....</b>	<b>33</b>
<b>TABLEAU II-3 : LA NATURE DES TRAITEMENTS REÇUS PAR LES DIFFERENTS LOTS .....</b>	<b>38</b>
<b>TABLEAU II-4 :SCORE IAM INDICE D'ACTIVITE DE LA MALADIE .....</b>	<b>39</b>
<b>TABLEAU II-5 : SCORE D'ULCERATIONS SELON (DESHMUKH C.D., 2010).....</b>	<b>40</b>
<b>TABLEAU II-6 : L'ECART LIMITE EN % PAR RAPPORT A LA MASSE MOYENNE DES GELULES....</b>	<b>45</b>
<b>TABLEAU III-1 : RESULTATS DE LA CARACTERISATION ZETAMETRIQUE.....</b>	<b>53</b>
<b>TABLEAU III-2: MOYENNE DES POIDS, LONGUEURS, ET RAPPORT POIDS/LONGUEURS DES COLONS RECUPERES.....</b>	<b>61</b>
<b>TABLEAU III-3 : PRINCIPE BANDE D'ABSORBANCE DU CHITOSANE PAR INFRAROUGE.....</b>	<b>69</b>
<b>TABLEAU III-4 : QUANTITE MAXIMAL D'ABSORPTION DANS LES TROIS GELULES. ....</b>	<b>72</b>

## Liste de la nomenclature

---

<b>CS :</b>	Chitosane.
<b>PHAs :</b>	Polyhydroxyalcanoates.
<b>PHBV :</b>	Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalérate.
<b>DA :</b>	Degré d'acétylation.
<b>GAG :</b>	Glycosaminoglycanes.
<b>IR :</b>	Infrarouge.
<b>MM :</b>	Masse moléculaire.
<b>AINS :</b>	Anti-inflammatoires non stéroïdiens.
<b>AIS :</b>	Anti inflammatoire stéroïdiens.
<b>AI :</b>	Anti-inflammatoire.
<b>COX :</b>	Cyclo-oxygénase.
<b>PG :</b>	Prostaglandine.
<b>MICI :</b>	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.
<b>MC :</b>	Maladie de Chron.
<b>RCUH :</b>	Rectocolite ulcéro-hémorragique.
<b>NFκB :</b>	Facteur nucléaire -Kappa B.
<b>IL 1-6-8 :</b>	Interleukines.
<b>DSS :</b>	Déxtran sulfate sodique.
<b>TNBS :</b>	Trinitrobenzène sulfonique.
<b>DNBS :</b>	L'acide 2,4 dinitrobenzène sulfonique.
<b>LT :</b>	Lymphocyte T.
<b>PA :</b>	Principe actif.
<b>HPMC :</b>	Hydroxypropylméthylcellulose.

<b>DCI :</b>	Dénomination Commune Internationale .
<b>TNF <math>\alpha</math> :</b>	Facteur de nécrose tumorale alpha.
<b>NO :</b>	Oxyde nitrique.
<b>CRD :</b>	Centre de recherche et de développement.
<b>IRTF :</b>	Infrarouge à transformée de Fourier.
<b>DLS :</b>	Diffusion dynamique de la lumière.
<b>PM :</b>	Poids moléculaire.
<b>AA :</b>	Acide acétique.
<b>IAM :</b>	Indice d'activité de la maladie.
<b>HE :</b>	Hématoxyline Éosine.
<b>CEI :</b>	Cellule Epithéliale Intestinal
<b>LPS :</b>	Lipopolysaccharide
<b>TLR :</b>	Récepteur de Type Toll
<b>TNFR :</b>	récepteur du facteur de nécrose tumorale
<b>ICAM :</b>	Molécule d'adhésion intercellulaire
<b>VCAM :</b>	Molécule d'adhésion cellule vasculaire
<b>EMPA :</b>	Le laboratoire fédéral d'essai des matériaux et de recherche

---

---

# INTRODUCTION GENERALE

## Introduction

L'inflammation est un processus homéostatique dont le but est de limiter les affections tissulaires, détruire l'agent causal et activer le processus de réparation tissulaire. Elle peut se manifester de manière aiguë ou chronique (Parke, et al., 1995), (Ferguson, 2010).

De nombreuses pathologies peuvent être liées à cette dernière. C'est le cas des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin connues sous l'acronyme MICI. Elles affectent l'être humain depuis des siècles, (Kirsner, 1988).

Les MICI est un groupe d'affections idiopathiques incluant la rectocolite ulcéro hémorragique (RCUH) et la maladie de Crohn (MC) qui affectent particulièrement l'adulte jeune (Louis, et al., 2012). Ces pathologies ne cessent de prendre de l'ampleur au cours de ces 20 dernières années. En effet l'incidence annuelle de la RCUH est estimée de 24, 3 et 258,6/100000 habitants et une prévalence de 505 et 248,6 /100000 habitants en nord de l'Europe et en Amérique du Nord respectivement (Molodecky, et al., 2012). En Algérie, on ne dispose pas de statistiques globales à l'heure actuelle. Les chiffres disponibles ne concernent que certaines populations algériennes. A Alger par exemple, la prévalence évaluée sur la période 2003–2006, a été estimée, en moyenne, à 20,7 /100.000 habitants. Ces résultats traduisent une prévalence faible (Balamane, et al., 2013).

Leur physiopathologie fait intervenir une composition anormale du microbiote intestinal (appelée dysbiose), une dysfonction de la barrière épithéliale, un déficit de l'immunité innée et une dérégulation de l'immunité adaptative. Par ailleurs les facteurs environnementaux semblent jouer un rôle important dans la survenue de ces maladies (G., et al., 2003).

Actuellement il n'existe toujours pas de traitement curatif contre les MICI mais seulement des traitements symptomatiques. La thérapie est basée sur l'administration quotidienne de doses relativement élevées d'anti-inflammatoires ou d'immunomodulateurs, associés à des effets secondaires graves et ne permettant qu'une rémission temporaire de la maladie (Chaparro, et al., 2016). D'autre part, malgré les progrès thérapeutiques réalisés au cours de ces dernières années avec l'introduction de plusieurs nouveaux agents anti-TNF $\alpha$  (, Timor Necrosis Factor alpha) un grand nombre de patients ne répondent pas à ces nouvelles thérapies (Bouguen, et al., 2013). Pour cela, le développement de nouvelles modalités de

traitement est nécessaire afin de permettre un meilleur contrôle de l'inflammation, qui doit présenter une bonne interaction avec le système immunitaire de la muqueuse et aussi permettre de rééquilibrer la flore intestinale.

Plus de 170 000 molécules bioactives ont été identifiées pour leurs effets contre ces maladies (Carillon, 2009). Les biopolymères sont largement répandus dans la médecine traditionnelle et très prometteuse. Ces derniers comprennent le Chitosane connu pour ses propriétés antibactériennes et antifongiques et pour son pouvoir de régénération tissulaire .Il C'est un biopolymère obtenu par désacétylation de la chitine issue des carapaces des crevettes.

Au cours de cette présente étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'effet Curatif du Chitosane sur la colite ulcéreuse induite par l'acide acétique chez des souris albinos males afin de déterminer l'effet anti-inflammatoire de ce biopolymère contre la Recto-colite ulcero-hémorragique. Par le suite nous avons tenté de donner au Chitosane une forme pharmaceutique convenable.

Pour cela notre étude est divisée en deux parties, la première partie de ce manuscrit constitue une étude bibliographique portant sur le Chitosane et ses applications dans le domaine médical, ainsi que sur l'inflammation plus particulièrement l'inflammation intestinale "la Rectocolite hémorragique ".La seconde partie expose les procédés expérimentaux réalisés au cours de nos travaux, suivie de la discussion des différents résultats obtenus.

---

# CHAPITRE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

# CHAPITRE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

## I.1 Les biopolymères

### I.1.1 Définitions

Les biopolymères aussi appelé les polymères bio-basés sont les polymères issus de la biomasse formés, dans la nature, au cours des cycles de croissance de tous les organismes. Ils sont considérés comme étant des polymères naturels. Leur synthèse est généralement catalysée par une enzyme. (RUTOT, et al., 2004).

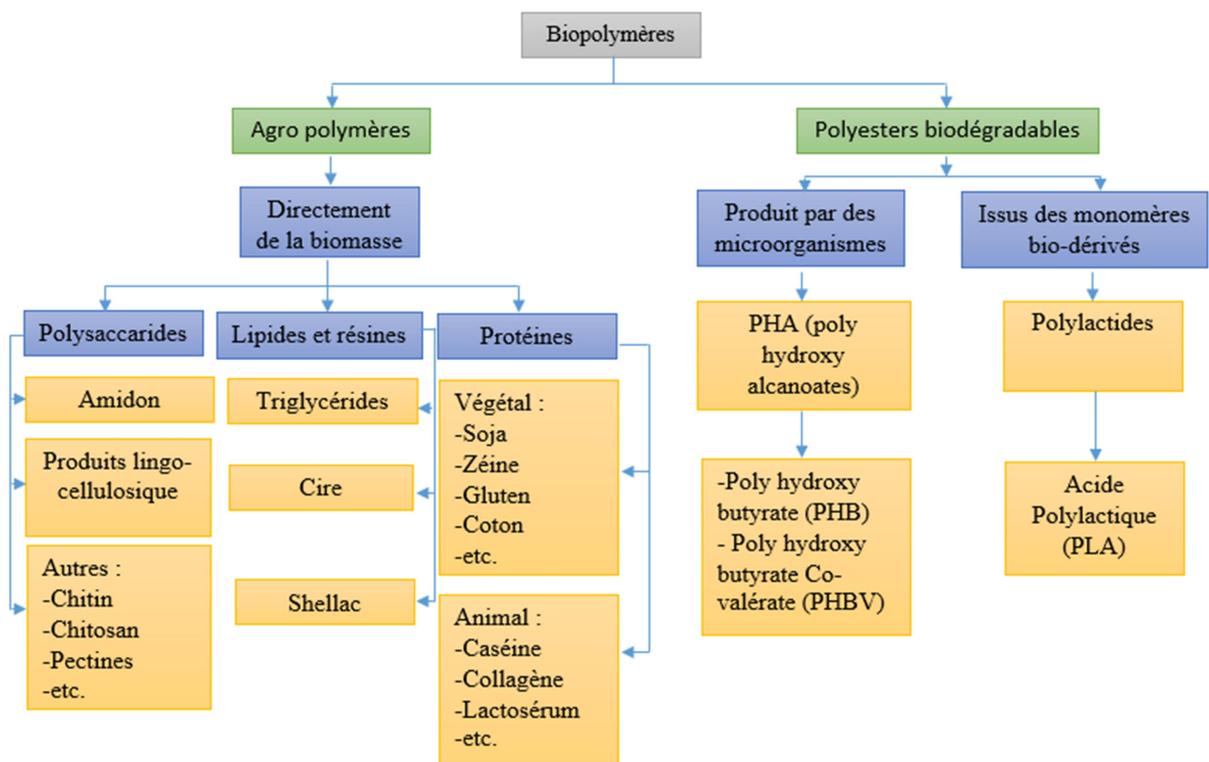


Figure I-1: Classification des polymères biodégradables

### I.1.2 Différents types de bio- polymères

#### I.1.2.1 Biopolymères issus de la Biomasse

Ce sont les polymères issus des plantes qui constituent la plupart du temps les parois cellulaires des végétaux comme la cellulose et la lignine ou issus de la biomasse animale

comme la chitine qui est un polysaccharide naturel extrait de coquilles de crabe, de crevettes, etc. (Hoi-Yan, et al., 2007) on y trouve :

**a) Les polysaccharides**

Les polysaccharides constituent la famille de biopolymères les plus répandus et les plus utilisés (RUTOT, et al., 2004). Parmi, ceux-ci nous pouvons citer

- Les polysaccharides (plantes/algues) : Amidon. Cellulose. Agar, Alginate, Carraghénane Pectine, Gommés, Konjac.
- Les polysaccharides (par fermentation bactérienne) Xanthane, Dextrane, Gellane, Curdlan, Pullulane et Elsinane.
- Les polysaccharides (carapace des crustacés) Chitine / Chitosane. (Rabetafika, et al., 28 mars 2006)

**b) Les protéines**

Les protéines comme la caséine (protéine du lait) ou le gluten sont très utilisées en tant que biopolymères. Ces protéines interviennent ainsi dans la formulation d'adhésifs ou de peintures présentant des propriétés barrières à l'oxygène et au gaz carbonique non négligeables mais très perméables à l'humidité. La gélatine est aussi très utilisée principalement dans la fabrication de tablettes et de capsules pour l'industrie pharmaceutique. (RUTOT, et al., 2004) On trouve aussi d'autres protéines comme : la zéine et les polyacides aminés (Rabetafika, et al., 28 mars 2006)

L'inconvénient majeur de l'utilisation des protéines comme matériaux biopolymères réside dans le prix de revient élevé des matériaux résultants. (RUTOT, et al., 2004)

**c) Les huiles végétales**

Parmi celles-ci, l'huile de lin est étudiée et utilisée en vue de la fabrication de nouveaux biomatériaux. Le lin, cultivé depuis des siècles dans une grande partie du globe, notamment en Amérique du Nord et en Chine, permet l'obtention, après pressage, d'une huile qui est un triglycéride riche en insaturations vinyliques. Les principaux acides gras constitutifs de l'huile de lin sont des acides gras insaturés à 18 atomes de carbone, dénommés acides linoléique, linoléique et oléique. (RUTOT, et al., 2004)

### **I.1.2.2 Biopolymères produits par polymérisation chimique**

Les polymères sont obtenus indirectement par polymérisation de monomères eux-mêmes issus de ressources végétales comme l'acide lactique, résultant de la fermentation de sucres ou encore des composés monomères réactifs dérivés d'huiles végétales (RUTOT, et al., 2004).  
On site :

#### **a) Les PLA (acide polylactique)**

Le poly (acide lactique), appelé aussi polylactide, est un polyester aliphatique connu pour sa biodégradabilité et sa biocompatibilité, et peut être considéré comme biopolymère car il est obtenu au départ de l'acide lactique, lui-même étant issu de la fermentation de saccharide par deux voies : la polycondensation de l'acide lactique ou la polymérisation d'ouverture de cycle du lactide, dimère cyclique de l'acide lactique. (RUTOT, et al., 2004)

#### **b) Biopolymères produits par des micro-organismes génétiquement modifiés (PHA, PHV, PHBV)**

Les polyesters naturels, produits par une grande variété de bactéries en tant que réserve énergétique intracellulaire, ont eu une attention particulière en tant que biopolymères. Ces polymères, des polyhydroxyalcanoates (PHAs), sont dégradables par les microbes : les microorganismes sécrètent des enzymes attaquant le polymère et le clivent en de petits segments capables d'être métabolisés par la flore microbienne. Dans un environnement aérobique, cette dégradation produit du méthane et du dioxyde de carbone. Jusqu'à présent, les bactéries constituent l'unique source de ces polyesters. Le poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) constitue une réserve de carbone dans un bon nombre de bactéries et a attiré l'attention en tant que polyester thermoplastique biodégradable. Ces polymères sont obtenus par voie métabolique qui fait intervenir des enzymes spécifiques à chaque étape de la biosynthèse. Afin d'accroître leurs propriétés et permettre leur utilisation en remplacement des plastiques conventionnels, de nombreux copolymères ont également vu le jour tel que le poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV). (RUTOT, et al., 2004)

### I.1.3 Chitosane

#### I.1.3.1 Généralité sur le Chitosane

Le Chitosane (CS) est un polysaccharide cationique naturel, peu répandu dans la nature. Il se trouve dans certains champignons, les zygomycètes, et dans la paroi abdominale des reines de termites. Par la suite il est obtenu dans l'industrie par d'acétylation de la chitine, biopolymère extrait de l'exosquelette des crustacés, des mollusques, des insectes et des certaines familles de champignons. (Sagheer, et al., 2009)

La chitine est l'un des polysaccharides les plus abondants dans la nature (deuxième après la cellulose) (Rivero, et al., 2009). Le CS est considéré comme appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (GAG), une sous-catégorie des polysaccharides, la seule qui a démontré une bioactivité, aspect très important en ce qui concerne les applications biomédicales. (Sokker, et al., 2009)

Ce biopolymère est formé d'une longue chaîne de disaccharide de N-acétyl-glucosamine et de glucosamine liée en  $\beta(1 \rightarrow 4)$ . Les structures de la chitine et du Chitosane diffèrent uniquement au niveau des groupements en position C-2 : acétamide pour la chitine et amine pour le CS. La chitine est caractérisée par la fraction de groupements N-acétamide résiduels appelée degré d'acétylation (DA). Le terme « Chitosane » est donc habituellement limité à toute chitine suffisamment N-déacétylée pour être soluble en milieu acide dilué. D'ordre général, nous appellerons CS tout échantillon avec des degrés d'acétylation résiduelles (DA)  $\leq 30\%$ . (Seng, 1988)

Le CS a trois types de groupes fonctionnels réactifs, un groupement amine et deux groupements hydroxyyles en positions C2, C3 et C6 respectivement. Grâce à ses groupements amines libres, ce composé possède des propriétés intéressantes qui diffèrent de celles de la chitine. Le Chitosane, soluble dans les acides faibles, possède une charge positive alors que la plupart des polysaccharides sont chargés négativement (Rinaudo, 2006)

Le Cs est considéré comme étant biodégradable puisqu'il est facilement hydrolysable et métabolisé par une variété d'enzymes tels que la chitosanase et les lysosymes. (Izume, et al., 1992)

### I.1.3.2 Production du Chitosane

La production commerciale du CS utilise la chitine provenant des crevettes et des crabes, les deux sources naturelles les plus abondantes, est composé généralement de quatre étapes : la déprotéinisation, la déminéralisation, la décoloration et la désacétylation. (Abuzaytoun, et al., 2005), (Skjak-braek G, 1989)

#### a) La déprotéinisation

La chitine à l'état naturel se présente en association avec les protéines (Chitinoprotéine). Ces protéines sont éliminées par un traitement basique en utilisant en général, des solutions à base de  $NaOH$ ,  $Na_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$ ,  $KOH$ ,  $K_2CO_3$ ,  $Ca(OH)_2$ ,  $Na_2SO_3$ ,  $CaSO_3$ , ou  $Na_3PO_4$ , de concentration de 0.1 à 5 mol/L. La solution d'hydroxyde de sodium (~10% *massique*) est la plus souvent utilisée pour dissoudre les protéines. La durée du traitement basique est de l'ordre de 0.5 à 72 heures à des températures (65~100°C). (suyatama, Juin 2006)

#### b) La déminéralisation

Elle se réalise par un traitement acide sous agitation pour solubiliser le carbonate de calcium et le chlorure de calcium. Les acides les plus souvent utilisés sont l'acide chlorhydrique et l'acide formique, à des concentrations de 1 à 10 mol/L. La durée du traitement acide dure jusqu'à 48 heures à une température ambiante. (suyatama, Juin 2006)

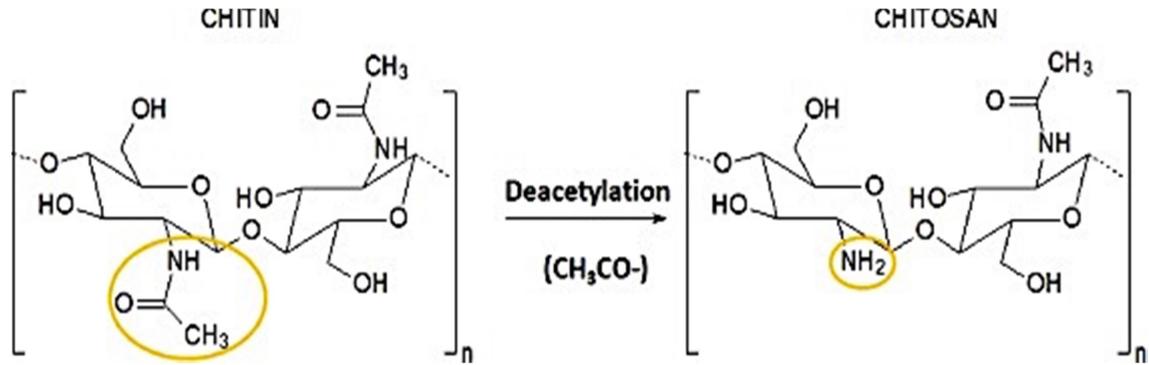
#### c) La décoloration

Pour les applications industrielles, la chitine obtenue à partir des crustacés doit être décolorée après les traitements acides et alcalins (**Figure I-2**) Erreur ! Source du renvoi introuvable. (H.K.Meyers, 1989) Le pigment dans les carapaces de crustacés forme un complexe avec la chitine. Il peut être enlevé par des réactifs tels que l'éthanol, l'éther, (Kyoung, et al., 2007) solution d'hypochlorite de sodium  $NaOCl$ , peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ ...etc. (C.J.Brine, et al., 1981), (M.N.Moorjani, 1975)

#### d) La désacétylation

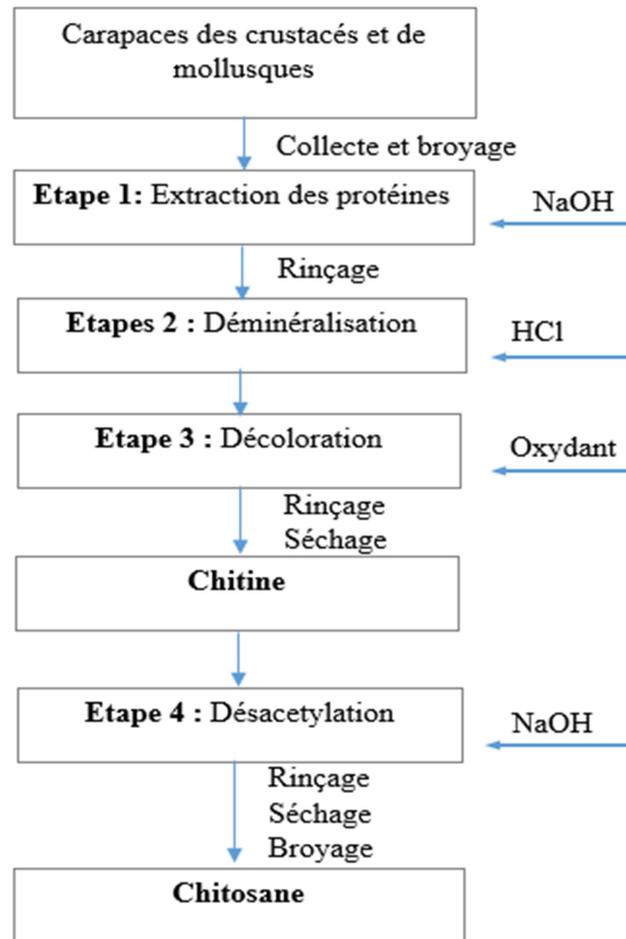
La désacétylation aboutit à la suppression de groupes acétyle ( $CH_3-CO$ ) libérant les groupes amines et confère au CS un caractère cationique.

En général, la chitine est partiellement désacétylée par N-désacétylation alcalines en utilisant des processus industriels pour produire différents polymères.



**Figure I-2 :** le passage de la chitine en Chitosane par désatellisation

Les quatre étapes Mentionnées sont souvent empiriques et varient avec le degré de déminéralisation des carapaces, les saisons et les conditions de températures. (R.A.A Muzarelli, 1998)



**Figure I-3 :** méthode de production de Chitosane

### e) Purification du Chitosane

Pour la plupart des applications, le Chitosane doit être purifié. On filtre donc le produit de base dissous dans une solution acide. La microfiltration est employée pour éliminer les composés insolubles et l'ultrafiltration pour éliminer les composés de faible masse molaire. Le filtrat est lavé et séché pour obtenir du CS sans amine libre.

#### I.1.3.3 Propriétés du Chitosane

##### a) Propriété physico-chimique du Chitosane

###### 1. Degré de désacétylation (DA)

Le degré de d'acétylation (DA) est l'une des propriétés les plus importantes du Chitosane il a un impact sur les caractéristiques chimiques et physiques et aussi sur la biodégradation et l'activité immunologique du Chitosane. (C., et al., 2001) Durant les dernières trente années, de nombreuses méthodes ont été développées pour déterminer le DA y compris la spectroscopie infrarouge (B.Acharya, et al., 2004), la spectroscopie U-V, la RMN, la titration colloïdale et la titration potentiométrique (Xuan, et al., 2003)

La méthode de la spectroscopie IR proposée par (Khan, 2000) reste la plus adéquate.

###### 2. Masse moléculaire (MM)

La masse moléculaire du Chitosane varie, selon la source et la procédure de préparation utilisée. En effet, la chaîne polymère peut être dégradée au cours des traitements de purification et d'acétylation, diminuant ainsi la masse moléculaire. (Kim et al. 2008). La masse moléculaire du CS peut être déterminée par plusieurs techniques, après mise en solution du polymère tel que : le viscosimètre capillaire ou dynamique à l'aide de l'équation de Mark-Houwink-Sakurada ; diffusion statique de la lumière via la construction d'un diagramme de Zimm et enfin chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière. Cette dernière technique est la plus utilisée. Il est important de déterminer la masse moléculaire du Chitosane car elle influence de nombreux paramètres physico-chimiques. Plus le poids moléculaire est important, plus les membranes du CS ont tendance à être visqueuses. Grace à sa masse moléculaire élevée et sa structure linéaire non ramifiée, le CS est un agent de forte viscosité dans les milieux acides et se comporte généralement comme un matériau pseudo-plastique. (Rodriguez-Vázquez M., et al., 2015)

Le poids moléculaire a aussi une relation avec l'affinité et la perméabilité aux protéines sériques. Lorsque le poids moléculaire est grand, l'affinité aux protéines sériques augmente tandis que la perméabilité diminue. D'ainsi que les poids moléculaires élevés sont communément associés à des taux de résorption du CS plus importants. (Rodriguez-Vázquez M., et al., 2015)

## **b) Propriétés biologiques du Chitosane**

### **3. Biocompatibilité**

D'après les tests cliniques aucune réaction inflammatoire ou allergique après implantation, injection, application topique ou ingestion de Chitosane dans le corps humain n'a été signalé. (Rodriguez-Vázquez M., et al., 2015)

La DL50 du Chitosane a été évaluée dans différentes conditions. Chez le rat, la DL50 était de 1500 mg/kg pour la voie orale et de 3000 mg/kg pour la voie intrapéritonéale. Chez la souris, la DL50 était supérieure à 10 000 mg/kg pour la voie sous-cutanée, de 5200 mg/kg pour la voie intrapéritonéale et supérieure à 16 000 mg/kg par voie orale. (Baldrick, 2010)

Globalement, et pour des doses administrées raisonnables, la non-toxicité du Chitosane est admise. (C., et al., 2001)

### **4. Biodégradabilité**

La biodégradabilité joue un rôle important en ingénierie tissulaire, ainsi que dans les applications vasculaires. Le CS n'est pas qu'un polymère portant des groupes amines, mais aussi un polysaccharide contenant des liaisons glycosidiques hydrolysables. Il peut être dégradé *in vivo* par des chitinases. De nos jours, huit chitinases humaines ont été identifiées, trois d'entre elles possédant une activité enzymatique sur le CS (Funkhouser, et al., 2007)

La biodégradation du Chitosane conduit à la formation d'oligosaccharides non toxiques de longueur variable, qui peuvent être incorporés dans les voies métaboliques ou encore être excrétés (Rodriguez-Vázquez M., et al., 2015) Le taux de dégradation du CS est lié, notamment, au DA et à la MM. (Lila et al.) Ont prouvé que des hydrogels de CS avec un DA important étaient résorbés plus rapidement après implantation sous cutanée chez le rat que des hydrogels de CS avec un DA faible (Rami, et al., 2014)

#### **I.1.3.4 Applications médicales du Chitosane**

De nos jours, le Chitosane a un grand intérêt dans le domaine médical et pharmaceutique grâce à son caractère biocompatible et biodégradable. En effet, il peut agir comme agent anti-thrombogénique, antibiotique et anti-tumorale. Il est employé dans une variété de systèmes implantables ou injectables pour la livraison d'agents thérapeutiques inhibant la resténose ou induisant l'angiogenèse. En outre, il accélère la guérison de blessures de divers tissus comme la peau, le cartilage et les os.

Le CS peut accroître les fonctions cellulaires et induire le relâche de cytokines permettant la réorganisation des tissus conjonctifs sans provoquer des inflammations ou allergies. Les biopolymères à base de CS sont retrouvés sous plusieurs formes comme l'hydrogels, films, fibres, microsphères ou comprimés selon leur usage. L'usage de CS dans la réparation vasculaire est de plus en plus fréquent car ce polymère constitue une plateforme intéressante pour les endoprothèses biodégradables, offrant une alternative aux endoprothèses usuelles. (Tardif, 2009)

Le CS sert aussi comme excipients d'encapsulation et relargage (médicaments, gènes...), produits dermatologiques (traitement de l'acné), pansements, bandages, fils de sutures chirurgicaux biorésorbables, membrane de dialyse Encapsulation/immobilisation d'enzymes, amaigrissants (lutte contre l'obésité) , gel dentaire, implants dentaires ,lentilles de contacts, liquides ophtalmiques. (Aranaz I., 2010)

#### **I.1.3.5 Les différentes activités biologiques du Chitosane**

##### **a) Activité antifongique et antibactérienne**

L'une des propriétés conférant au Chitosane un grand intérêt pour les applications médicales et agro-alimentaires est son activité antibactérienne et antifongique vis-à-vis d'un large spectre de bactéries et champignons. Par exemple (C.Aimin, et al., 1999). Ont montré que le Chitosane réduit la vitesse de développement de l'infection dans le cas d'une ostéomyélite induite expérimentalement chez des lapins par staphylococcus aureus. (C.Aimin, et al., 1999)

Le cas bactériostatique du Chitosane chez les lapins a été mise en évidence vis-à-vis de nombreuses autres souches : Eschrichia, pseudomonas, et de champignons : candida, Fasarium, Saccharomyces, etc. (Young, et al., 2002).

En ce qui concerne le mécanisme d'action du Chitosane repose sur son caractère polycationique. En solution, ses résidus *GlcN* ( $-NH_2$ ) sont protonnés ( $-NH_3^+$ ). Les charges positives du Chitosane peuvent se lier à la membrane des bactéries chargées négativement. Ces interactions entraînent la diminution de la stabilité osmotique, la destruction de la membrane et éventuellement la perte des éléments intra-bactériens. Une hypothèse est que la nature cationique du Chitosane interagit avec les résidus chargés négativement qui sont présent à la surface de la membrane externe des bactéries ; (kauss, et al., 1982) ceci conduit à une perméabilité de la paroi cellulaire bactérienne, et donc une fuite des composants intracellulaires.

Le Chitosane a aussi la possibilité de se lier particulièrement avec certaines macromolécules et formerait des liaisons avec les protéines et les électrolytes présent dans le cytoplasme : il perturberait alors l'action de certaines enzymes et inhiberait la synthèse d'ARNm en se liant à l'ADN bactérien, après pénétrations dans le noyau du microorganisme. (E.I Rabea, et al., 2003)

Cette hypothèse est toutefois plus controversée que celle basée sur l'interaction avec la membrane externe.

### **b) Activité antioxydante**

En raison des atomes d'hydrogène protique des groupements amines au niveau de carbone C2 ou hydroxyles au niveau des carbones C3 et C6 du Chitosane, ce biopolymère a une activité antioxydante formant des radicaux macromoléculaires (Vinsova et Vavrikova, 2011). 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 (Pasanphan et al., 2010).

### **c) Activité anti-tumorale**

L'activité anti-tumorale du Chitosane est issue de sa structure chimique qui contient deux groupements actifs (groupements amine au niveau du C2 et groupements hydroxyles au niveau du C3 et du C6). En fait, les interactions entre les charges positives du Chitosane ( $NH_3^+$ ) 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 (Schipper et al., 1997). Pour l'activité anti-tumorale,

L'activité anti-tumorale 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 (Qin et al., 2002); (Vinsova et Vavrikova, 2011).

#### **I.1.3.6 Définition de l'inflammation**

L'inflammation est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression dans le but d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires.

Tantôt elle peut être nuisible due à l'agressivité de l'agent pathogène, sa persistance, au siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation. (MC Rousselet, et al., 2005).

Elle se manifeste par la présence de cinq phénomènes pathologiques macroscopiques : gonflement du tissu, élévation de la température tissulaire, rougeur du tissu vasculaire, sensation de douleur, et enfin altération et perte de fonction de la partie affectée du corps. (Yougbaré-Ziébro, et al., 2015).

#### **I.1.3.7 Les différentes formes de l'inflammation**

On distingue deux types d'inflammation :

##### **a) Inflammations aiguës**

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours ou semaines), défini par des phénomènes vasculoexsudatifs intenses. Ce type d'inflammations guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante.

##### **b) Inflammations chroniques**

Inflammations n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évoluent et demeurent à persister et s'aggraver pendant plusieurs mois ou plusieurs années. (MC Rousselet, et al., 2005).

### **I.1.3.8 Les anti-inflammatoire**

En fonction de leurs modes d'action, on en distingue 3 types :

#### **a) Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)**

Les AINS sont des médicaments symptomatiques actifs sur la fièvre, les douleurs par excès de nociception et la composante vasculaire de la réaction inflammatoire. Ces trois propriétés résultent de leur mode d'action commun : l'inhibition de l'isoenzyme COX-2 de la cyclo-oxygénase ou prostaglandine (PG) synthétase. Aux doses recommandées, certains AINS épargnent en revanche COX-1 (coxibs) contrairement à d'autres (AINS classiques ou conventionnels) (Bannwarth, 2005).

Selon la structure chimique de ces composés, on distingue les AI (indoliques, arylcarboxyliques, oxicams, anthraniliques, pyrazolés, salicylés.), mais ils peuvent avoir des effets indésirables, sur le système gastro-intestinal (dyspepsie, nausées, ulcères et saignements), cardiovasculaire, hépatique, rénal et neurologiques (vertiges, céphalées) . (Ziltener, et al., 2010).

#### **b) Anti inflammatoire stéroïdiens (AIS)**

Ils agissent sur toutes les composantes de l'inflammation en s'opposant à l'action de la phospholipase A2 qui est l'enzyme catalysant la libération de l'acide arachidonique, qui est un constituant des membranes cellulaires, jouant un rôle important dans l'inflammation. Les AIS bloquent donc, la libération de cet acide à partir des membranes cellulaires. Ils ont donc une action globale et rapide sur l'inflammation. (K. SOUAGA, et al.) .Parmi les AIS les plus familier les Cortisones, Prednisolone, Bétaméthasone et l'Hydrocortisone, leur utilisation peut altérer des effets secondaires comme les troubles métaboliques, gastro-intestinales (dyspepsie, ulcère), rénaux, hématologiques, ophtalmiques, du sommeil, neuropsychiques : euphorie aussi des déficits musculo-squelettique et des convulsions. (Roumestan, et al., 2004).

#### **c) Les anti-inflammatoires enzymatiques**

Ils ont un mode d'action totalement différent des précédents. Ils ont une action purement protéolytique en dégradant les éléments cellulaires et circulants. (K. SOUAGA, et al.).

### **I.1.3.9 Les maladies inflammatoires de l'intestin**

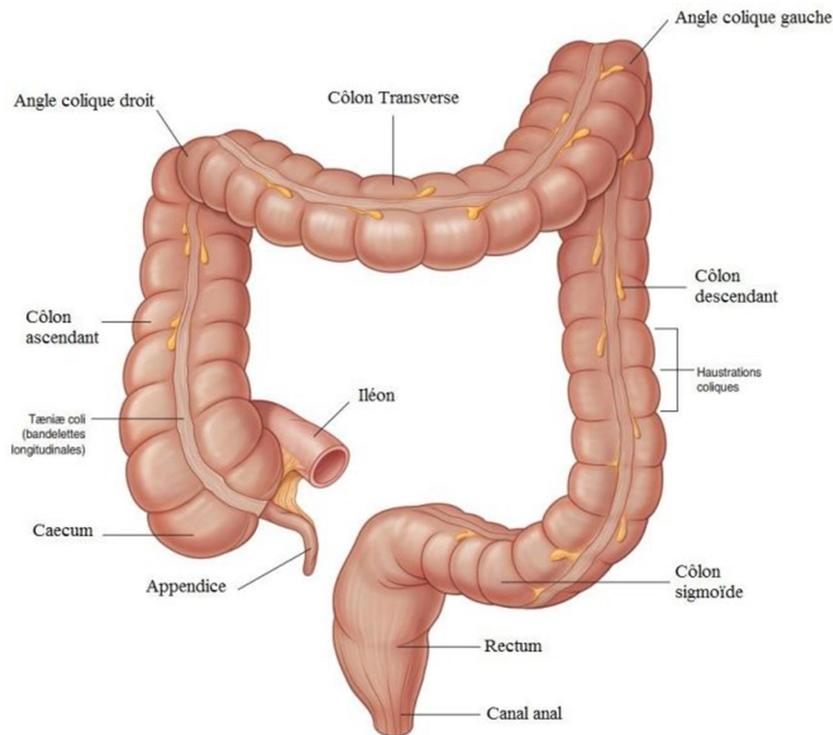
Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont des affections caractérisées par une inflammation chronique ou récidivante de la paroi intestinale. Il s'agit de maladies dites « complexes », multifactorielles et polygéniques.

Il y a deux types de MICI classiquement reconnus : la maladie de Crohn (MC) qui se caractérise par une atteinte multifocale et transmurale de la paroi digestive pouvant toucher n'importe quel segment de la bouche à l'anus et la rectocolite ulcérohémorragique (RCUH) qui s'identifie par une atteinte muqueuse d'un seul tenant, démarrant au rectum et remontant sur une longueur variable, mais n'atteignant que le colon. Cette distinction est une réalité clinique, récemment confirmée par les avancées génétiques. Cependant il existe une grande variété de présentation tant de la MC que de la RCUH avec des formes de passage entre ces deux affections. (E. Louis, 2010)

### **I.1.3.10 L'anatomie du colon**

Le colon est la partie du gros intestin comprise entre la valvule iléo-caecal et la jonction rectosigmoïdienne. Il mesure environ 1,5 m. Il se divise en 4 segments :

- Le côlon droit, ou côlon ascendant, situé du côté droit du corps. Il commence par le cæcum qui relie le côlon à l'intestin grêle et se prolonge vers le haut jusqu'au côlon transverse.
- Le côlon transverse traverse la partie supérieure de l'abdomen. Il relie le côlon droit au côlon gauche.
- Le côlon gauche, ou côlon descendant, longe le côté gauche du corps. Il part du côlon transverse et se prolonge vers le bas jusqu'au côlon sigmoïde.
- Le côlon sigmoïde est la dernière portion du côlon. Il relie le côlon gauche au rectum.



**Figure I-4 :** Les différents segments du colon.

Le colon peut-être le siège de plusieurs pathologies y compris : polypes coliques (croissance de tissu supplémentaire dans le côlon), diverticulite (inflammation ou infection des poches dans le côlon), Le syndrome du côlon irritable, la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragie. (Gerard, 2017).

#### **I.1.3.11 Microbiote intestinal**

Le microbiote intestinal est un ensemble important de bactéries (cent mille milliards) réparties le long du tractus intestinal et dont la composition varie selon la localisation, les individus, l'âge, les périodes de la vie d'un même individu. Le nombre de bactéries hausse progressivement de l'estomac (moins de  $10^4$ /g de contenu) jusqu'au côlon ( $10^{11}$  à  $10^{12}$  /g) en passant par le duodénum le jéjunum et l'iléon. Le passage de la valvule iléo-cæcale permet l'entrée dans le côlon. L'ensemble constitue un écosystème qui fonctionne comme un organe à part entière en étroite symbiose avec notre organisme et forme avec lui un supra-organisme. C'est une usine biochimique essentielle pour la digestion des aliments non absorbé par l'organisme et pour diverses fonctions physiologiques : maturation du système immunitaire, effet barrière contre des pathogènes extérieurs, production de vitamines, collecte d'énergie, accessibilité aux micronutriments, métabolisation des xénobiotiques. . (P.Bourlioux, 2013).

Les perturbations du microbiote intestinal sont impliquées aussi bien dans certaines pathologies intestinales que dans des pathologies extra-intestinales. Parmi ces pathologies, il faut citer les (MICI) su type MC et RCUH, l'obésité, le syndrome métabolique , certaines pathologies cardiovasculaires, certaines pathologies allergiques et avec plus de prudence, l'autisme (Landman C., 2015).

Ce déséquilibre de la microflore normale peut être du a plusieurs raisons :

- Une alimentation trop riche en graisses d'origine animale et trop pauvre en fibres ;
- Une rupture brutale de l'équilibre à la suite d'une gastroentérite aiguë, ou induite par une antibiothérapie ;
- Une accumulation, dans la petite enfance, d'événements qui interfèrent avec l'établissement de l'eubiose intestinale (l'hypothèse d'hygiène) Chacune de ces causes peut représenter un facteur de risque de développer une MICI. (Oumaira Rahmouni, 2016).

### **I.1.3.12 La RCUH**

C'est un groupe d'affections caractérisé par une inflammation polymorphe touchant la partie inférieure du tube digestif et évolue par poussées ou de façon chronique sur une partie plus ou moins importante du colon. (E. Louis, et al., 2012).

#### **a) Aspect macroscopique**

La RCUH prédomine au niveau du colon gauche. Les proctites (9 %), recto sigmoïdites (23 %) et les lésions inflammatoires prédominantes à gauche (24 %) sont les formes les plus fréquentes de la maladie. Des pancolites sont observées dans 11 à 30 % des cas. Le risque d'extension de forme limitée de RCH n'est pas formellement établi mais possible dans certains cas. L'apparence macroscopique des dommages varie selon les stades de la maladie :

**En poussée évolutive ou au début de la maladie**, les haustrations coliques sont effacées. La muqueuse est tapissée de mucus ou de sang et parsemée de nombreuses pétéchies. Des ulcères de taille et formes variable apparaissent. Plus étendus, ils forment des sillons longitudinaux, creusant la muqueuse et réalisant des ponts muqueux associés à un infiltrat inflammatoire très important. Quand ces ulcérations confluentes, elles mettent largement à nu la sous-muqueuse. La séreuse peut présenter un aspect congestif sur un segment souvent plus étendu que celui correspondant aux lésions muqueuses.

**En phase de guérison**, les ulcères se réépithélialisent progressivement, laissant apparaître de petits nodules rouges sessiles (les pseudopolypes), correspondant à des îlots de muqueuse inflammatoire se détachant en surplomb. Ils sont habituellement petits, nombreux et ne prennent que rarement une configuration filiforme.

**Dans les stades plus avancés**, le colon devient fibreux, rétréci ou raccourci, la lésion peut s'étendre en profondeur et entraîner une dilatation importante d'un segment colique. la paroi est amincie, fragilisée et peut alors se perforer (mégacolon toxique). Les pseudopolypes sont rares dans le rectum ou la congestion et les friabilités muqueuses prédominent. Par contre, ils sont plus fréquents dans le sigmoïde et dans le colon descendant.

Cependant, quel que soit le stade d'évolution, elles sont limitées à la muqueuse ou à la partie superficielle de la sous-muqueuse.

#### **b) Aspect microscopique**

L'aspect microscopique de la RCUH est particulié ; il associe à la fois réaction inflammatoire et anomalies architecturales muqueuses. La réaction inflammatoire se manifeste par son aspect diffus, intense, transmural et mixte, composée de lymphocytes, de plasmocytes et de polynucléaires neutrophiles. Les anomalies architecturales sont habituellement présentes. Elles comprennent des altérations de l'épithélium de surface qui devient irrégulier et a pseudo vilieux et des anomalies architecturales cryptiques. Les cryptes apparaissent irrégulières, ramifiées, bifides et raccourcies. Une perte du nombre de cryptes peut conduire à une atrophie muqueuse. (K., et al., 1999) .

#### **c) Les différentes formes de la RCUH**

Suivant l'extension anatomique des lésions de la muqueuse recto-colique, on constate quatre formes illustrées dans le **Tableau I-1** (Baumgart D.C., 2007) .

**Tableau I-1:** Les différentes formes de la RCUH

<b>Formes</b>	<b>Régions atteintes</b>
Rectite	Rectum
Recto-sigmoïdites	Rectum et le sigmoïde
Colite distale	Rectum jusqu'au haut du colon descendant
Pancolite	Totalité du côlon

#### **d) Etiologie et pathogénie**

L'étiopathogénèse de la RCUH demeure largement controversée mais les manifestations cliniques et les données épidémiologiques étant allogènes, cela montre que de nombreux facteurs pourraient contribuer à la survenue d'une RCUH ou encore influencer son profil évolutif. (Fiocchi, 1998).

##### **❖ Les facteurs environnementaux**

**Les habitudes alimentaires :** certaines habitudes favorisent le déclenchement d'une RCUH comme la consommation de sucres raffinés et les produits industrialisés ; ce qui exprime, le taux augmenté de cette maladie dans les pays riches et les milieux urbains. (Ekbohm, 2004).

##### **❖ Les facteurs psychologiques**

Les facteurs psychologiques tels que le stress ne semblent pas avoir de rôle précis, mais leur excès favorise le déclenchement et la sévérité des poussées (Vidal, et al., 2006).

##### **❖ Les facteurs génétiques**

Plusieurs gènes ont été prouvés contribuant, en présence de facteurs exogènes, à la prédisposition de la RCUH. Cependant la susceptibilité génétique ne peut à elle seule tout expliquer car le taux de concordance chez les jumeaux monozygotes n'est pas de 100% mais uniquement de 6% pour la RCUH. (Cortot, et al., 2008).

##### **❖ Les facteurs immunologiques**

L'inflammation intestinale résulte d'une altération entre la flore intestinale et les cellules de la lamina propria, dans un contexte de polymorphisme génétique touchant la fonction de la barrière épithéliale, ainsi que la réponse immunitaire innée et adaptative (Vaishnava, et al., 2008).

**La dysbiose intestinale** un déséquilibre entre les bactéries protectrices et délétères qui forme le microbiote intestinal. Ce déséquilibre provoque l'évolution de la rectocolite ulcéro-hémorragique (Frank, et al., 2011), (Klotz, et al., 2015).

**Modification de la barrière épithéliale :** La dégradation de la barrière épithéliale intestinale par la baisse de la sécrétion du mucus et la dégradation des jonctions intra

épithéliales est lié à une élévation de la perméabilité cellulaire; ce qui facilite l'entrée du contenu luminal au cellules immunitaires de la lamina propria et participe à l'aggravation de l'inflammation (Welcker, et al., 2004) ce qui explique le cas de la diminution de la quantité du mucus et l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium retrouvé dans la forme pathologique de la RCUH. (Khor, et al., 2011), (Maloy, 2011).

**Dérégulation de la réponse immunitaire :** En conditions normales, la muqueuse intestinale fonctionne avec un équilibre délicat des cellules inflammatoires afin de préserver l'homéostasie alors que lors des pathologies intestinales, la réponse immune est dérégulée face aux antigènes des bactéries commensales, ce qui mène à un déséquilibre du profil de production des cytokines aux différents stades de la maladie (Pizarro, 2007).

#### **e) Symptômes et Complications**

La RCUH s'identifié par la survenue d'une multitude de symptômes tels qu'une réctorragie suivie d'émission de sang et de glaires, de diarrhées, de douleurs abdominales elle peut également entraîner une fièvre ou un amaigrissement Certains patients développent des manifestations extradigestives cutanées et ostéo-articulaires. (Bouhnik, 2006).

Les complications les plus redoutables de la RCUH sont : la survenue d'une colectasie (Philippe MARTEAU, et al., 2004) et le développement d'un cancer colorectal (Jess, et al., 2012).

#### **f) Diagnostique**

Les principaux examens réalisés sont une prise de sang et une analyse des selles, néanmoins les seuls examens qui peuvent confirmer le diagnostic de RCH sont les examens endoscopiques tels que la coloscopie du rectum et du côlon. (Beaugerie, et al., 2014), (Moreau, 2012).

#### **g) Approche thérapeutique**

Il n'ya pas de médicament qui permet la guérison de la RCUH, mais des traitements diminuant l'inflammation et ses signes. Les stratégies thérapeutiques de la RCUH regroupent des produits pharmacologiques et des interventions chirurgicales. Elles sont adaptées aux malades selon l'étendue des lésions et la sévérité des poussées.

- **Approche médicamenteuse**

Plusieurs molécules ont été proposées dans le traitement de la RCUH dont les effets sont suspensifs et non curatifs. (Colombel, et al., 2010).

La première approche implique les anti-inflammatoires représentés par les salicylés traitant les formes légères de la colite ulcéreuse (Marteau, et al., 2004) , Le plus souvent prescrit est la Salazopyrine. Mais il a des effets indésirables tels que : des insuffisances rénales, des vomissements, des diarrhées, des troubles hématologiques et même des effets sur la fonction sexuelle. (DeMichele, et al., 2012).

En cas d'une cortico-résistance ou une cortico-dépendance, un traitement à activité immuno-modulatrice (l'azathioprine) pourrait être envisagé (Khan, et al., 2011).

D'autres traitements biologiques tels que les anticorps dirigés contre le TNF $\alpha$  représentent la nouvelle vague thérapeutique la plus efficace et la plus coûteuse (Allez., 2008)

- **Approche chirurgicale**

Le traitement chirurgical est proposé comme dernier recours chez les patients en cas de complication ou de résistance au traitement médical, d'une colite aiguë grave, ou encore lors d'un risque accru d'un cancer colorectal, (Hanauer, et al., 2002) Son principe repose sur l'ablation d'une partie du côlon et/ou du rectum malade ou susceptible de le devenir (Parkes, et al., 2007).

**I.1.3.13 Les différents modèles de l'induction d'une inflammation intestinale**

Pour mieux comprendre l'immunité et les interactions entre la flore et l'hôte dans des conditions normales et inflammatoires, des modèles de MICI ont été développés :

**a) Les modèles « toxiques »**

Ce fait par l'administration d'un composé chimique toxique qui déclenche une colite avec des lésions sévères par altération de la barrière intestinale. Il existe plusieurs voies d'administration du toxique tel que le lavement (éthanol concentré, acide acétique ou formaline) et la prise orale (sulfate de dextrane sodique (DSS) dans l'eau) (Nancey, et al., 2008).

**b) Les modèles « immunologiques »**

Ce sont des molécules chimiques de faible poids moléculaire non immunogènes par elles-mêmes, appelées haptènes comme l'acide 2, 4,6 trinitrobenzène sulfonique (TNBS) ou l'acide 2,4 dinitrobenzène sulfonique (DNBS). Leur administration a faible dose non toxique dans le côlon entraîne la formation d'un complexe entre ce dernier et certains acides aminés cela en interagissant avec les protéines du contenu et des parois coliques qui déclenche une réponse immunitaire.

Le mécanisme est une hypersensibilité retardée colique médiée par les LTCD4+ ou LT CD8+ spécifiques, cytotoxiques, en produisant des cytokines et qui s'accompagnent d'une inflammation récidivante de l'intestin (Nancey, et al., 2008).

**c) Les modèles de transfert à des souris immunodéprimées**

Il est représenté par le transfert d'une population particulière de LT CD4+ dits « naïfs », à des animaux immunodéprimés (souris dépourvues de LT et de lymphocytes B). Ces animaux reconstitués avec cette sous-population lymphocytaire T particulière développent progressivement un infiltrat inflammatoire puis des lésions coliques qui surviennent dans les 3-10 semaines suivant le transfert. (Nancey, et al., 2008).

## **I.2 L'encapsulation**

### **I.2.1 La forme pharmaceutique solide (forme sèche)**

Les formes posologiques oraux solides tels que les comprimés, les poudres, les capsules ... sont bien acceptées par les patients comme une forme de traitement efficace et indolore. (Capsules Fridrun Podczeck, 2002).

### **I.2.2 Les capsules**

Les capsules sont les plus polyvalentes de toutes les formes de dosage, elles sont plus faciles à avaler et utilisées par les fabricants lorsque le médicament ne peut pas être mis en comprimés.

Les capsules sont des préparations solides constituées d'une enveloppe dure ou molle, de forme et de capacité variables, contenant un ou plusieurs ingrédients médicinaux. (Capsules Fridrun Podczeck, 2002).

### **I.2.3 L'avantage des capsules**

- Les capsules masquent l'odeur et la saveur désagréable des excipients ou de PA et peut être facilement administré.
- Elles sont économiques, attrayantes en apparence et faciles à manipuler et à transporter.
- Elles sont glissantes lorsqu'elles sont humides donc, faciles à avaler avec un courant d'eau.
- Nombre d'adjuvants réduit ce qui facilite la formulation et les contrôles. Par rapport aux comprimés les capsules sont physiologiquement inertes et facilement et rapidement digérés dans le tractus gastro-intestinal.
- Les coquilles peuvent être opacifiées (avec du dioxyde de titane) ou coloré, pour offrir une protection contre la lumière.
- Possibilité de réaliser des formes gastro-résistantes et à libération modifiée. (B.Srividya, et al., 2014).

### **I.2.4 Inconvénients des capsules**

- Les médicaments hygroscopiques absorbent l'eau de l'enveloppe de la capsule ce qui la rend fragile et donc ne sont pas appropriés pour le remplissage en capsules.
- La solution concentrée qui nécessite des dilutions ne conviennent pas pour les capsules parce que si administrés comme tels conduisent à une irritation de l'estomac. (B.Srividya, et al., 2014).

### **I.2.5 Types de capsules**

#### **I.2.5.1 Capsules à enveloppe molle**

Aussi appelé capsule « monobloc » constitué d'une enveloppe souple scellée hermétiquement en une seule pièce. Elles sont plus appropriées pour les huiles ou médicaments qui doivent être dissous dans les huiles ou d'autres liquides afin d'aider le médicament à être absorbé dans l'estomac. (Garg Deepak, et al., 2014), (B.Srividya, et al., 2014)elles sont faites de gélatine et d'eau, avec l'addition d'un plastifiant « l'alcool polyhydrique », tel que le glycérol ou le sorbitol, pour les rendre flexible. Ils contiennent habituellement un agent conservateur, comme le bétanaphthol. (Prasad, July 2017).



**Figure I-5 :** Les capsules à enveloppe molle

Les capsules viennent en différentes formes telles que sphérique, elliptiques, oblongues et tubes spéciaux avec et sans torsion. (B.Srividya, et al., 2014). Les capsules moles peuvent contenir l'actif ingrédient en solution, suspension ou émulsion, qui conduira intrinsèquement à une meilleure absorption de l'ingrédient actif, (Garg Deepak, et al., 2014), et ce qui est importants lorsque la substance médicamenteuse est volatiles ou susceptibles de se détériorer présence d'air. (B.Srividya, et al., 2014).

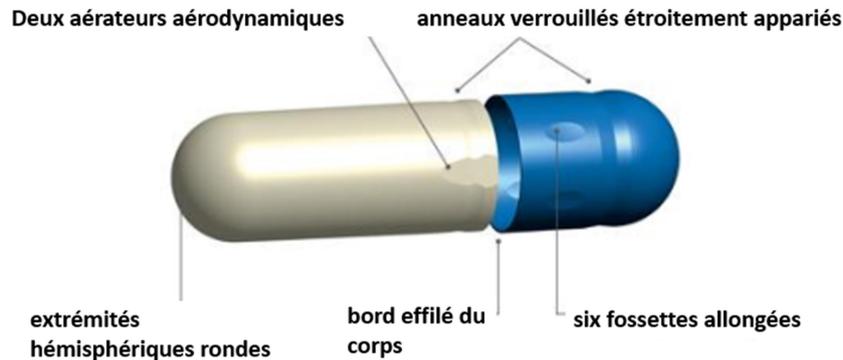
#### **a) Les capsules à enveloppe molle à base autre que gélatine**

La source animale de gélatine peut être un problème pour certains consommateurs comme les végétariens et les entités religieuses ou ethniques (juifs, musulmans, hindous, etc.).un autre problème est la température et la sensibilité à l'humidité des gélules molles qui complique l'utilisation de ces capsules à base de gélatine dans des conditions très chaudes et humide nécessitant des conditions d'emballage et de stockage spéciaux. Pour cela une alternative a été trouvé, Des gélules molles fabriquées à partir de base d'ingrédients végétal. Ils ont tous les avantages de la norme des gélules moles, mais ne contiennent pas de gélatine. (B.Srividya, et al., 2014)

#### **I.2.5.2 Capsule a enveloppe dure**

Aussi appelée capsule a « deux pièces ». Se compose de deux pièces sous forme de petits cylindres fermé à une extrémité, la pièce plus courte est appelée le « capuchon » qui s'ajuste sur l'extrémité ouverte de l'extrémité plus longue pièce, appelée le « corps ». **Figure I-5** (B.Srividya, et al., 2014)

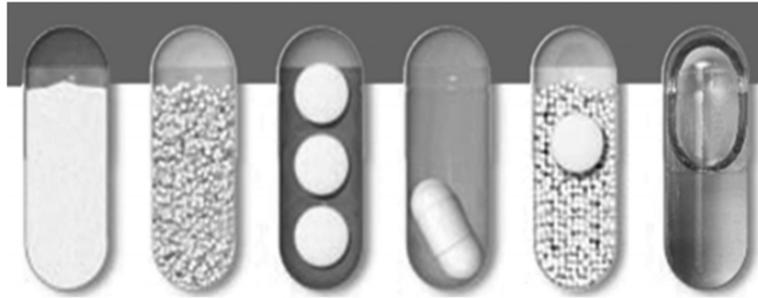
## Les Capsules Coni-Snap



**Figure I-6** : Les capsules Coni-Snap.

Les gélules traditionnelles de gélatine sont fabriquées à partir d'un mélange de gélatine, de sucre et de l'eau. Ils sont clairs, incolores, et essentiellement sans goût Les capsules de gélatine se dissous dans le liquide gastrique chaud et libérer le contenu. (Jony Mallik, et al., 2013), (B.Srividya, et al., 2014).\*

Les capsules dures offrent une flexibilité et rapidité de développement, et sont un excellent outil pour contenir de nombreux types de matériaux de remplissage, y compris ceux qui sont difficiles à mettre sous forme de comprimés. Les matériaux de remplissage les plus courants pour les capsules sont les poudres, les granulés, les mini tablettes, les pastilles, les comprimés, les liquides et semi-solides Comme illustrés dans **Figure I-6**et (Larry L.Augsburger, 2017).



**Figure I-7 :** Exemples sur les matériaux de remplissages possibles des capsules

#### a) Capsule à enveloppe dure à base autre que la gélatine

Des alternatives à la gélatine ont été étudiées pour des raisons de stabilité ou l'alternative la plus courante est l'HPMC. (Larry L.Augsburger, 2017) L'hypromellose (DCI), abréviation de hydroxy propylméthyl cellulose (HPMC), est un semi-synthétique polymère viscoélastique inerte utilisé comme excipient et composante d'administration contrôlée dans les médicaments oraux. (Dr. Dayaram Patel, et al., 2016)

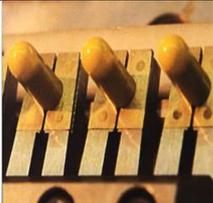
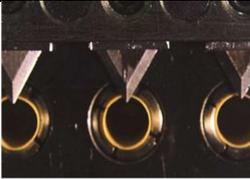
L'HPMC a été largement étudié et développé avec succès en capsules dure pour une utilisation dans les industries pharmaceutiques et nutritionnelles. Parmi les avantages importants du HPMC, sa teneur en eau d'environ 4 à 7 % comparativement aux gélules de gélatine, qui se situent habituellement entre 13 et 16 %, mais on ne peut pas ignorer son grand taux de perméabilité des gaz qui peut être une considération pour l'oxygène composés. (Larry L.Augsburger, 2017)

Une autre alternative est l'amidon, Récemment des capsules d'amidon ont été utilisées dans divers produits à libération contrôlée et de façon générale, à mesure que la demande de produits à base non animale augmentait.

Les capsules d'amidon sont plus faciles à encapsulé que les capsule de gélatine, ces derniers peuvent ramollir et se solubiliser lors de la pulvérisation avec la dispersion aqueuse d'enrobage et peut devenir fragile pendant la phase de séchage. (Prasad, July 2017)

**b) Procède de fabrication des gélules à enveloppes dure**

**Tableau I-2 :** Étapes impliquées dans la production d'enveloppe de la gélule avec une brève description

Etapes	Description	Figures
Immersion	Les paires de broches en acier inoxydable (métalliques) sont plongées dans la solution de trempage pour former simultanément les bouchons et les corps. La solution de trempage est maintenue à une température d'environ 500C dans un bac à trempette gainé chauffé	
Filage	Les broches sont tournées pour distribuer la gélatine sur les broches uniformément et pour éviter la formation d'une perle à la capsule extrémités	
Séchage	La gélatine est séchée par un souffle d'air frais pour former une coquille dure. Les broches sont déplacées à travers une série de fours de séchage pour enlever l'eau	
Démontage	Une série de mâchoires en bronze dénudent les parties des capsules des broches	
Ajustage	Le capuchon dénudé et les parties du corps sont taillés selon les besoins longueur par couteaux fixes.	
Jonction et Éjection	Après le parage, le capuchon et les sections du corps sont alignés et rejoint, finalement éjecté de la machine. L'ensemble du cycle du processus dure environ 45 minutes	

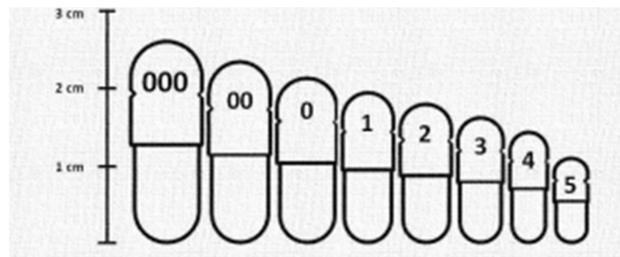
**c) Colorants et impression de capsules**

Les colorants pour capsules sont un moyen important de créer une identité de marque forte et d'éviter la confusion des produits, surtout pour les patients âgés qui prennent de multiples médicaments. La plupart des organismes de réglementation exigent des moyens supplémentaires d'identification des produits pour les capsules pharmaceutiques. Les colorants pour capsules doivent satisfaire trois principales exigences :

1. Approbation réglementaire dans les pays destinés à la distribution.
2. Image de marque et marketing.
3. Acceptation du patient. (Larry L.Augsburger, 2017).

**d) Taille et forme de capsules dures**

Les capsules vides de gélatine à usage humain sont disponibles dans les industries en 8 différentes tailles allant de 000 (le plus grand) à 5 (le plus petit).



**Figure I-8 :** tailles et formes des capsules dures.

**Tableau I-3 :** Différentes tailles de capsules en termes de volume d'eau et de poids

<i>Taille de capsules</i>	<i>Volume d'eau (ml)</i>	<i>poids approximatif (gm)</i>
000	1.37	1.00
00	0.95	0.65
0	0.68	0.50
1	0.50	0.32
2	0.37	0.25
3	0.30	0.20
4	0.21	0.15
5	0.13	0.10

### e) Procède de fabrications (remplissage)

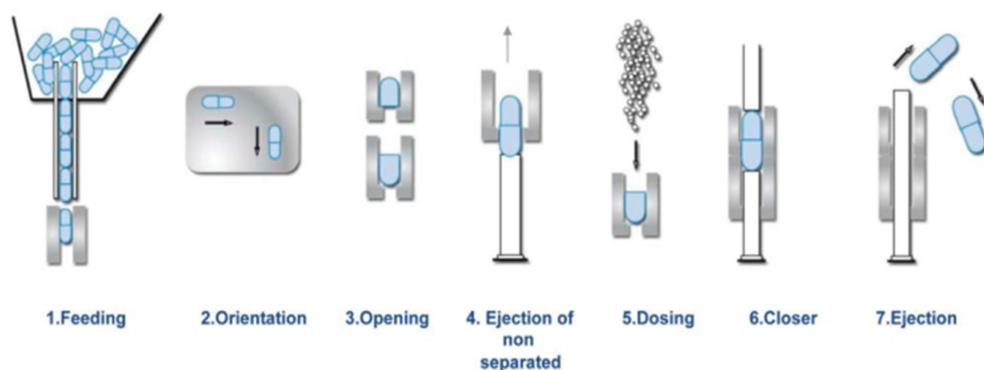
Habituellement, deux types de machines sont utilisés pour le remplissage des ingrédients dans la gélule

- Machine manuelle ;
- Machine semi-automatique ou automatique.

Que ce soit le Fonctionnement manuel, semi-automatique ou automatique les machines de remplissage de capsules sont développées pour petite, moyenne et grande échelle d'opérations de remplissage respectivement.

Fondamentalement toute opération de remplissage de la capsule passe par les étapes suivantes :

- Chargement des capsules dans le plateau du chargeur (manuel ou automatique)
- Séparation des capuchons du corps ;
- Remplissage de la poudre dans le corps ;
- Effacement de l'excédent de poudre ;
- Remplacement du capuchon et du sceau ;
- Nettoyage de l'extérieur de la capsule remplie et polir. (Jony Mallik, et al., 2013)



**Figure I-9** : les étapes de fonctionnement de base de toutes les machines de remplissage de capsules dures. (Larry L.Augsburger, 2017)

### f) Polissage des capsules

Après le remplissage de la capsule, ils sont soumis au processus de polissage. Dans le cas de la machine à remplissage automatique le polissage reste associé à la machine. Le polissage des capsules est requis pour :

- Enlever les traces de poudre de la surface de la capsule.
- Les médicaments hygroscopiques absorbent l'humidité de l'atmosphère et peuvent détériorer le produit, le polissage est nécessaire pour éviter ces types de médicaments
  - Pour enlever les empreintes digitales de la surface de la capsule
  - Pour améliorer l'apparence de la capsule. Il ya un certain nombre de processus impliqués dans le polissage des capsules, le polissage poêle et au sel, broyage, époussetage de tissu (Jony Mallik, et al., 2013)

---

# CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE

## CHAPITRE II: PARTIE EXPERIMENTALE

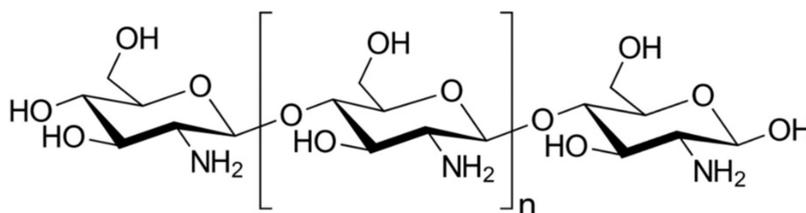
### II.1 Produits et animaux

#### II.1.1 Biopolymère (Chitosane)

Dans notre étude nous avons utilisé une poudre du Chitosane issu des carapaces de crevette déjà préparé au laboratoire comme principe actif (**Figure II-1**), dont la caractérisation physico-chimique sera faite ultérieurement.



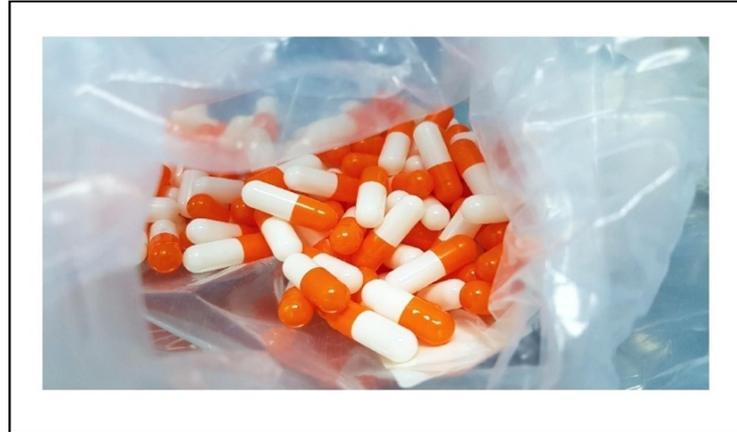
**Figure II-1** : Poudre du Chitosane utilisé, issu des carapaces de crevettes.



**Figure II-2** : Formule développée du Chitosane.

### II.1.2 Les gélules

Afin d'encapsuler le Chitosane nous avons utilisé des gélules traditionnelles de gélatine de taille 0 avec tête orange moyen C354 et corps blanc (jaunâtre) au service de recherche et développement au laboratoire BEKER –Dar el Beida. **Figure II-3**



**Figure II-3:** Photo des gélules a base de gélatine de taille 0 par Laboratoire BEKER-Dar El Beidha

La composition de la gélule est illustrée dans le tableau suivant :

**Tableau II-1:**Composition de la gélule

Composition du corps de la gélule	Composition de la tête de la gélule
-TitaniumDioxide (opacifiant) -Gélatine	-Titanium dioxid (opacifiant) -Sunset yellow FCF-FD&C Yellow 6 (Colorant) -Gélatine

### II.1.1 Animaux

Afin d'évaluer l'activité anti-inflammatoire intestinale du Chitosane, nous avons utilisé 36 souris albinos mâles (**Figure II-4**), d'un poids variant entre (30-35 g) âgés d'environ 8 semaines, obtenues auprès de l'institut pasteur d'Alger (El-Hamma).

Les souris ont été transférées à L’animalerie du CRD-Saidal de Gué de Constantine où le travail a été effectué, elles ont été réparties en 6 lots dans des cages de 6 souris soumises à des conditions de température ambiante de (23-26°C), et à un cycle de jour et nuit de 12 heures d’éclairage /d’obscurité afin de respecter leur cycle biologique avec accès libre à l’aliment et à l’eau. **Figure II-5**



**Figure II-5 :** Photo montrant la répartition des souris en 6 lots.

**Figure II-4 :** Photo des souris albinos (Animalerie de CRD Saidal, Gué de Constantine 2019)

## II.2 Appareillage

**Tableau II-2 :** Appareils utilisés en expériences.

Spectrophotomètre UV-Visible	UV-1800, Shimadzu
Spectrophotomètre IRTF	JASCO FT/IR-6800
Appareil Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	Nanoparticules SZ-100 (HORIBA – SCIENTIFIC)
Désintégrateur	Désintégrateur TOYAMA
Dissolu-test	ERWIK

## II.3 Méthodes

### II.3.1 Caractérisation Physico- chimique du Chitosane

#### II.3.1.1 Degré d'acétylation

Dans le but de détermination du degré d'acétylation une analyse IRTF a été réalisée 2mg de Chitosane a été soigneusement mélangés avec 100 mg de KBr analytique, pour produire des pastilles de 0,5 mm d'épaisseur. Les pastilles ont été séchées pendant 24 heures à 110°C sous pression réduite. Un spectromètre infrarouge a été enregistré avec un spectromètre JASCO FT/IR-6800, à l'aide d'un KBr de 100 mg à titre de référence. L'intensité des bandes d'absorption maximale a été déterminée par la méthode de référence (Baseline).

Le degré d'acétylation (DA) est l'un des propriétés les plus importante caractérisant le Chitosane, Il influe non seulement sur les caractéristiques chimiques et physiques, mais aussi sur la biodégradabilité et l'activité immunologique du Chitosane. (Elias A., 2006)

La spectroscopie Infrarouge (IR) est une technique rapide proposée par (KHAN, et al., 2002) pour évaluer qualitativement le DA en calculant les rapports des absorbances d'une bande caractéristique d'un groupement acétyle sur une bande commune aux unités acétylés et désacétylés.

Le spectre de l'échantillon du Chitosane a été obtenu dans une plage de fréquence de 4000 à 400  $\text{cm}^{-1}$ , et le DA est déterminé comme suit :

$$DA\% = [(A_{1320}/A_{1420} - 0.03822)/0.03133] \times 100$$

$$DD\% = 100\% - DA\%$$

II - 1

Avec  $A_{1320}$ ,  $A_{1420}$  sont les absorbances des pics à 1320  $\text{cm}^{-1}$  et 1420  $\text{cm}^{-1}$ .

La bande à 1320  $\text{cm}^{-1}$  caractéristique d'un groupement amide ( $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-CO$ ) pour déterminer le degré d'acétylation et la bande à 1420  $\text{cm}^{-1}$  caractéristique du groupement  $C-C$ .

On obtient une relation linéaire entre le rapport  $A_{1320}$  et  $A_{1420}$  et le degré d'acétylation.

### II.3.1.2 Analyse UV-VISIBLE

Afin de connaître la longueur d'onde d'absorption du Chitosane dans le domaine de l'UV-Visible, une solution de Chitosane à 0.25% diluée dans une solution d'acide acétique à 2% , a été préparé puis balayé par un spectre UV-Visible de 200 – 800 nm, à l'aide d'une cellule en Quartz d'un trajet optique de 1cm et un spectrophotomètre de marque 'UV – 1800, shimadzu' développé pour les mesures d'absorbance d'échantillon liquide, En parallèle des systèmes hauts précision et haute énergie.

### II.3.1.3 Poids Moléculaire

Le poids moléculaire du Chitosane est une caractéristique très importante qui peut avoir un impact majeur sur les différentes activités du Chitosane ainsi que ses mécanismes d'action.

Le poids moléculaire été déterminé à travers la viscosité. Cette dernière dépend du volume hydrodynamique de la macromolécule, qui est une fonction du poids moléculaire, des propriétés de conformation et des interactions polymère-solvant.

Les mesures de viscosités sont effectuées en préparant une solution de 500mg de Chitosane dissoute dans 50ml d'une solution d'acide acétique à 1% puis préparer une série de dilutions de (5, 4.5, 4 , 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5 et 1) mg/ml.

Analyser la viscosité dynamique de chaque échantillon puis calculer la viscosité réduite, ensuite tracer une courbe d'étalonnage et faire sortir la viscosité intrinsèque ( $\eta$ ).

Le poids moléculaire moyen ( $PM$ ) a été calculé par l'équation de Mark-Houwink :

$$\eta = K \cdot M^\alpha \quad \text{II - 2}$$

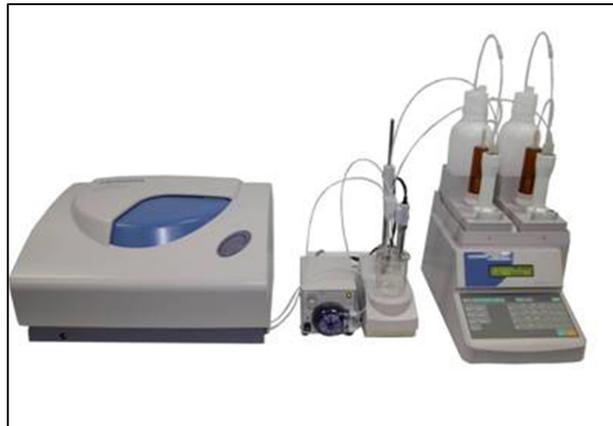
Avec :

- $\eta$ : Viscosité intrinsèque
- $M$  : poids moléculaire
- $K$  et  $\alpha$  : paramètres qui dépendent du système polymère-solvant a une température donnée (dans ce cas  $K = 1.18$  et  $\alpha=0.93$ ).

### II.3.1.4 Détermination de la taille des particules par Diffraction dynamique de la lumière (DLS Dynamic Light Scattering en anglais)

Afin de déterminer la taille des particules de Chitosane en solution, une solution de 35mg de Chitosane dissout dans 15ml d'acide acétique à 2% puis passer dans un filtre de 0.45 micromètre pour une distribution homogène de l'échantillon.

Une cellule en Quartz a été remplie de la solution et placée dans l'appareil de DLS (SZ-100 (HORIBA –SCIENTIFIC) lié à un ordinateur (**Figure II-6**), L'analyse de la taille des particules est répétée trois fois puis prendre la moyenne.



**Figure II-6** : Photo de l'appareil de Diffraction dynamique de la lumière Nanoparticules SZ-100 (HORIBA-SCIENTIFIC).

### II.3.1.5 Potentiel Zeta

Pour déterminer la charge électrique des particules de Chitosane lorsqu'il est en solution, une solution de 35mg de Chitosane dissout dans 15ml d'acide acétique à 2% injecté dans une cellule (Glod-Plating, 6 mm). Puis passé dans l'appareil SZ-100 (HORIBA – SCIENTIFIC) pour mesurer le potentiel Zêta. **Figure II-6**

## II.3.2 Etude de l'activité anti-inflammatoire intestinale du Chitosane

### II.3.2.1 Préparation de la solution de Chitosane a gavée

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire du Chitosane, il a été donné comme traitement contre l'inflammation intestinal chez les souris par gavage.

Trois solutions de Chitosane de différentes doses ont été préparées en dissolvant respectivement 1g, 0.75g, 0.5g dans 3ml d'eau distillé comme illustré dans **Figure II-7**.



**Figure II-7 :** Photo de la préparation de la solution de Chitosane pour gavage.

### II.3.2.1 Induction et traitement de la maladie

L'étude suivante a pour but de confirmer l'activité anti-inflammatoire du Chitosane et comparer la réduction de la colite après administration des différentes doses préparées.

L'étude expérimentale de cette activité a été réalisée selon la méthode de (Xianomin Wang, 2008) avec certaines modifications, les souris des 6 lots ont été pesées et numérotés. Cinq lots ont été privés de nourriture pendant 12 heures avant de provoquer une inflammation colique via l'administration de 100  $\mu$ l d'acide acétique (AA) à 5% par voie rectale (Inflammation Subaigüe). Les souris ont été ensuite maintenues dans une position verticale pendant 30secondes pour limiter l'expulsion de la solution d'AA. **Figure II-8.** Le sixième lot (lot témoin sain) reçoit une solution saline seulement.



**Figure II-8:** Photo montrant la méthode d'induction des colites chez les souris par l'acide acétique à 5% par voie rectale

**Tableau II-3:** La nature des traitements reçus par les différents lots

Lot	Traitement	
1	Solution de 0.166g /kg de Chitosane par jour.	+ RCUH
2	Solution de 0.125g /kg de Chitosane par jour.	+ RCUH
3	Solution de 0.0833g /kg de Chitosane par jour	+ RCUH
4	Médicament de référence (Dexaméthasone) 1mg/kg	+ RCUH
5	Control ; Eau distillé. (Véhicule)	+ RCUH
6	Témoin : Eau distillé.	

Après 2 heures, trois lots d'essai ont reçu une administration de 0.5 ml de solution de Chitosane dans l'eau par voie orale à des doses de 0.5g/kg, 0.75g/kg et 1g/kg pendant 6 jours équivalent de 0.0833g/kg, 0.125g/kg et 0.1666g/kg par jour respectivement en une seule prise par jour. Un lot de référence est traité aussi par gavage avec un anti-inflammatoire utilisé en thérapeutique (Dexaméthasone) à une dose de 1mg/kg. Le lot témoin et control négatif reçoivent 0.5 ml d'eau distillée par gavage chaque jour. **Figure II-9**



**Figure II-9:** Présentation de la méthode du gavage (Animalerie - CRD Gué de Constantine).

L'état des souris en ce qui concerne leur activité et leur pelage, était suivi chaque jour. L'effet des différentes doses de Chitosane sur la survie des souris a été déterminé en calculant chaque jour le pourcentage de viabilité (V%) selon la formule suivante décrite par l'EMPA:

$$V\% = \left( \frac{Nj_x}{Nj_0} \right) \times 100 \quad \text{II} - 3$$

$Nj_x$ : Nombre de souris à n'importe quel jour de traitement (jour x)

$Nj_0$ : Nombre initial de souris (au jour 0)

### II.3.2.2 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire intestinale du Chitosane

#### a) Indice d'activité de la maladie

L'indice d'activité de la maladie (IAM) a été enregistré quotidiennement en observant l'évolution pondérale corporelle, celle des selles et des saignements. Chaque observation a été réalisée selon la méthode de (Cooper, et al., 1993). Comme citer dans le **Tableau II-4**

**Tableau II-4** : Score IAM Indice d'activité de la maladie

Score	Perte de poids %	consistance des selles	Hémorragie
0	Aucune	Normale	absence
1	1 - 5		
2	5 - 10	selles molles	saignement laigé
3	10-20		
4	>20	Diarrhée	Saignement important

-L'indice d'activité de la maladie est calculé comme somme des 3 scores précédents.

Après traitement pendant 6 jours, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale après anesthésie. Les colons ont été récupérés et libérés du tissu adipeux adhérent, rincés doucement avec une solution saline, pesés, mesurés et observé macroscopiquement.



**Figure II-10:** Photo illustrant la dissection des souris après les 6 jours de traitement.

**b) Score macroscopique (score d’ulcération)**

Le score des dommages macroscopiques (ulcérations) qui a été attribué selon les critères de (Deshmukh C.D., 2010). Citer dans **Tableau II-5**

**Tableau II-5:** Score d’ulcérations selon (Deshmukh C.D., 2010)

Score	Dommages macroscopique
<b>0</b>	Aucun changement macroscopique (absence d’ulcérations)
<b>1 et 2</b>	Erythème muqueux, érosion et ulcérations légère
<b>3 et 4</b>	Ulcération grave, érosion sévères, œdème

**c) L’effet des différentes doses du Chitosane sur le rapport poids sur longueurs des colons**

La longueur du côlon a été mesurée en cm entre la jonction iléo-caecale et le rectum proximal et son poids a été mesuré en g, le rapport P/L (poids / longueur) a été calculé pour chaque souris car il est considéré comme indicateur de l’étendue de l’inflammation colique

(SOTNIKOVA Ruzena, et al., 2013). En comparant la réduction de l'inflammation chez les souris traitées par rapport aux témoins non traités par l'AA.

Les colons sont ensuite conservés dans une solution de formol à 10% pour une étude histologique ultérieurement.

### II.3.2.3 L'Analyse statistique

L'étude statistique a été réalisée en utilisant le logiciel Graph Pad Prisme suivie par une analyse de la variance à sens unique (One way ANOVA) en utilisant le test de Dunnett pour comparer les valeurs des groupes testés par rapport au groupe témoin sain. Les différences sont considérées significatives à  $*p < 0,05$ , hautement significatives à  $**p < 0,01$ , et très hautement significatives à  $***p < 0,001$ .

### II.3.2.4 Observation microscopique (étude histologique)

Les prélèvements des colons récupérés et conservés dans le formol sont adressés au service d'anatomopathologie du CHU de Douéra.

Cette étape consiste à étudier l'histologie de ces tissus à un niveau microscopique et permet de comprendre leur fonctionnement normal ou pathologique, afin de déterminer laquelle des doses de notre produit a donné un effet anti-inflammatoire remarquable par rapport au témoin sain, témoin négatif et au lot traité par le médicament de référence.

Dans cette étude les échantillons sont passés par plusieurs étapes :

#### a) Examen macroscopique

Le fragment est soumis à un examen macroscopique qui constitue la première étape à réaliser dans l'étude histopathologique, ou les colons sont déposés dans deshisto-cassettes, perforées en plastique, spécifiques selon la nature du prélèvement. **Figure II-11**

Ces cassettes sont identifiées puis placées directement dans du formol pur avant le passage dans l'appareil à circulation.



**Figure II-11** : Photo du dépôt de l'échantillon dans des histo-cassettes et leur fermeture.

### b) La circulation

Cette étape est réalisée à l'aide d'un automate, dans le but de remplacer l'eau présente dans le tissu par la paraffine afin de faciliter la découpe. **Annexe II-1**

Cette opération est effectuée en trois étapes :

- **La déshydratation** : Les prélèvements sont placés dans des bains successifs d'éthanol de concentration croissante puis : 70°, 75°, 80°, 85°, 90°, 95° et 100° (45 minute chacun) pour s'en débarrasser de l'eau que contient le tissu.
- **Eclaircissement** : L'éclaircissement est réalisé dans trois bains de Xylène (2h chacun) c'est une étape permettant le remplacement de l'éthanol présent dans les tissus par le solvant de la paraffine.
- **Imprégnation** : Elle consiste en le remplacement du Xylène présent dans les cellules par la paraffine liquide.

Les prélèvements sont placés successivement dans trois bains de paraffine en fusion (à 60°) afin de s'assurer de l'imprégnation totale du tissu.

**c) Etape d'enrobage**

Elle consiste à enrober les prélèvements déshydratés par la paraffine pure en utilisant des moules en inox. On a eu pour finalité un bloc rempli de paraffine qui, une fois durci, sera démoulé et taillé afin d'avoir des bords parallèles. **Annexe II.2**

**d) Etape de coupe par microtome**

Le bloc taillé a été placé dans un microtome de type Leica. Celui-ci a permis de réaliser des tranches d'une épaisseur de  $2\mu m$  sous forme de ruban, ce dernier est mis directement dans un bain marri de  $37^\circ$  détendre la paraffine puis recueillies sur des lames en verre puis cette dernière est déposée sur une plaque chauffante pour faire fondre la paraffine et éliminer le résidu d'eaux. **Annexe II-3**

**e) Etapes de coloration et montage**

Les lames sont placées dans l'équipement Dako-Cover-Stainer responsable de la procédure de coloration en passant par les étapes suivantes :

- Étuvage des lames.
- Déparaffinage.
- Réhydratation puis la coloration proprement dite.

La coloration utilisée est celle de routine HE (hématoxyline Éosine) : le noyau est révélé en bleu par l'hématoxyline d'Harris alors que l'éosine permet d'obtenir un cytoplasme rose.

Le procédé prend d'environ 40 minutes, à la fin on reçoit les lames recouvertes de lamelles prêtes à être observés sous microscope optique. **Annexe II-4.**

### **II.3.3 Fabrication des gélules**

#### **II.3.3.1 Méthode de Remplissage**

Le remplissage s'est fait manuellement à l'aide d'une balance à cause de la petite quantité de Chitosane comme principe actif. Chaque capsule contient  $166mg$  de PA. La procédure s'est déroulée au laboratoire BEKER –Dar El Beidha.

### **II.3.3.2 Control qualité des capsules :**

Les contrôles doivent répondre aux exigences de la pharmacopée et aux normes de sécurité nécessaires lors de la manipulation de ces produits. Ils peuvent être réalisés à plusieurs niveaux au cours de la fabrication

Les capsules ont été soumises aux différents tests établis par la pharmacopée européenne 9<sup>ème</sup> comme suit :

#### **a) L'aspect**

La description de l'aspect porte normalement sur la couleur et la forme physique. Cette comparaison n'est pas supposée être effectuée, mais elle est exigée par la pharmacopée européenne. Pour cela la détermination de la taille et la couleur des gélules ainsi que ceux du principe actif est faite.

#### **b) Identification du principe actif**

La Pharmacopée européenne propose plusieurs méthodes pour identifier la matière première telle que la chromatographie liquide haute performance ou la spectrophotométrie infra-rouge.

L'identification de notre principe actif a été faite par spectrophotométrie infra-rouge.

#### **c) Poids moyen et uniformité de poids**

La Pharmacopée européenne propose de peser individuellement 20 gélules prises au hasard et de déterminer la masse moyenne. La masse individuelle de deux au plus des 20 gélules peut s'écarter de la masse moyenne de 10 % (si la masse moyenne est inférieure à 300 mg) ou de 7,5 % (si la masse moyenne est supérieure ou égale à 300 mg), mais la masse d'aucune gélule ne peut s'écarter de plus du double de ce pourcentage. Le mode opératoire consiste à peser une gélule pleine puis, sans perdre de fragments de l'enveloppe, à vider le contenu et à peser l'enveloppe. La masse du contenu est calculée par différence. L'opération est répétée sur les 19 autres gélules. (Pharmacopée euro 9<sup>ème</sup>)

**Tableau II-6 :** L'écart limites en % par rapport à la masse moyenne des gélules.

Poids moyen	L'écart limites en % de la masse moyenne
< 300 mg	+/- 10%
≥ 300 mg	+/- 7,5%

**d) Test de désintégration**

L'essai de désintégration permet de déterminer si les capsules se désintègrent avec un temps prescrit lorsqu'elles sont placées dans un milieu liquide dans les conditions d'intégration prescrites.

Afin de savoir le temps de disparition de la capsule elle-même le test de désintégration consiste à prendre 6 capsules et introduire une dans chaque tube et suspendre l'appareil dans un bécher contenant 60 ml d'eau à 37 °C – si des capsules dures flottent à la surface de l'eau, le disque peut être ajouté. L'appareil se fait un mouvement alternatif vertical d'une amplitude de 50 à 60mm : 30±2 déplacements (montée et descente) par minute.

Une fois la machine mise en marche, il faut attendre 30 minutes et observer l'absence de résidus durs. Si aucun résidu dur n'est présent, le test est accepté (Pharmacopée euro 9<sup>eme</sup>).



**II-12:** Photo du Désintégrateur TOYAMA-Laboratoire BEKER-Dar El Beidha

**e) Essai de dissolution**

Le dissolu-test est un appareil utilisé pour réaliser le test de dissolution in vitro des formes pharmaceutiques orales solides.

Les pharmacopées préconisent 2 types de dissolu-test ; l'appareil à palette tournante et l'appareil à panier tournant. Ce dernier est utilisé dans le cas des capsules et des comprimés non enrobés. Erreur ! Source du renvoi introuvable.



**Figure II-13:** Photo du dissolu-test ERWIKA -Université de Blida 1

Le test de dissolution permet d'estimer la vitesse de libération du PA.

Une solution standard est préparée en mettant une quantité (m) de principe actif correspondant à la dose contenue dans une gélule (166 mg) dans un volume de 900 ml du milieu de dissolution HCl 0.1N volume, mettre sous agitation sous une température maintenue à 37°C puis analysée par spectrophotométrie UV-Visible à des longueurs d'onde allant de 200 à 800 nm pour déterminer le maximum d'absorbance. En fixant la longueur d'onde à 230nm, afin d'obtenir  $Q_{\infty}=100\%$  correspondant au maximum de libération du principe actif.

Les essais de dissolution du principe actif ont été réalisés à l'aide d'un appareil de dissolution à paniers tournant.

Les échantillons (sous formes de Capsules) sont soumis à une agitation constante dans 900 *ml* de milieu de dissolution préparé précédemment, à une température constante de 37 °C. La vitesse de rotation des palettes est fixée à 75 *tr/min*. Aux temps de prélèvement prédéterminés chaque 10mn pendant 2h.

Des échantillons de 5 *ml* du milieu ont été prélevés à l'aide d'une seringue puis introduite dans des tubes. Le contenu de chaque tube a été dosé par spectrophotométrie UV-Visible à 230 *nm*. Après l'obtention des absorbances et des concentrations on calcule le pourcentage de la quantité de Chitosane libéré  $Q(t)$ .

---

# CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

## CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

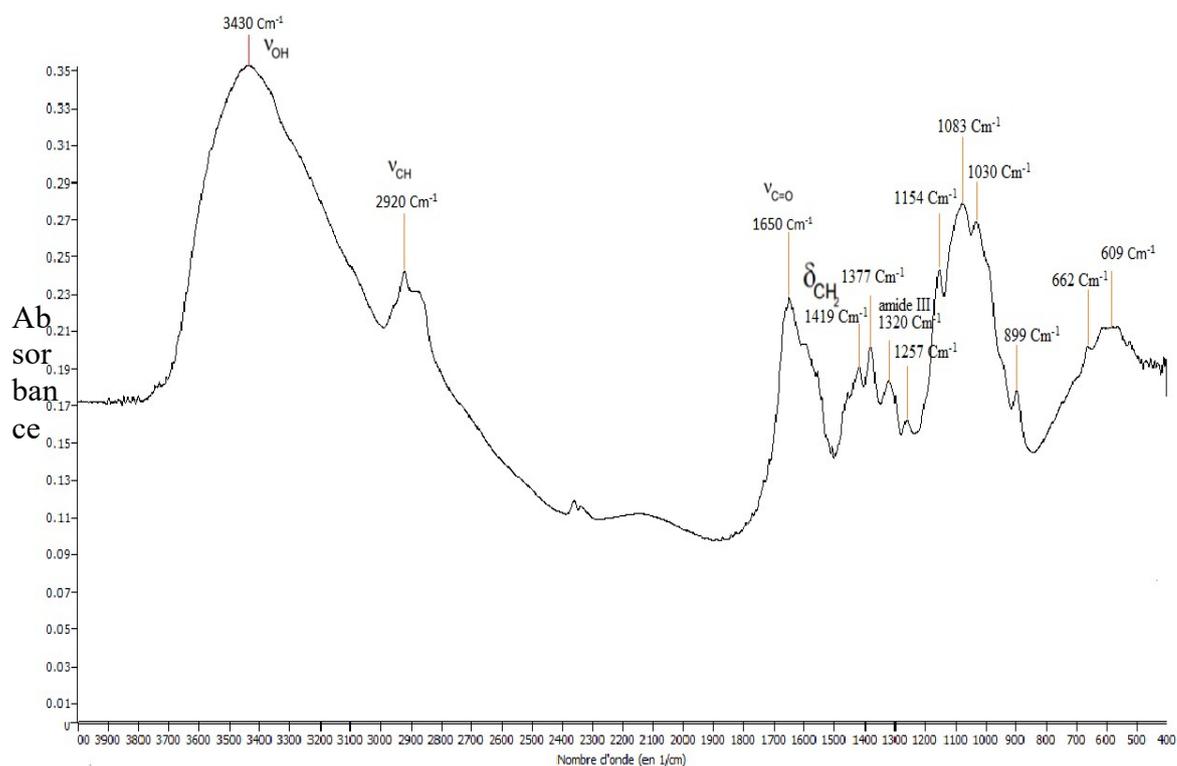
### Résultats

#### III.1 Caractérisation physico-chimique du Chitosane

Afin de caractériser notre Chitosane les différents tests suivants ont été réalisés :

##### III.1.1 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Afin d'avoir des données relatives au Chitosane, une analyse par méthode spectroscopique infra rouge est effectuée. Le spectre IRTF représenté sur la **Figure III-1** donne les principales bandes caractéristiques du Chitosane utilisé.



**Figure III-1** : Spectre infrarouge (IRTf) du Chitosane.

En analysant le spectre IRTF du Chitosane, on peut observer un ensemble de bandes caractéristique de la structure saccharidiques du Chitosane. En effet, on constate une bande large vers  $3430\text{ cm}^{-1}$  correspond à l'élongation des groupements hydroxyles- OH, masquant celles des liaisons amino des amines primaires  $-NH_2$ . Une autre bande est observé vers 2920

$\text{cm}^{-1}$  correspondant au groupement méthyles CH primaire. Vers  $1154\text{cm}^{-1}$  on peut voir une bande qui peut attribuer à l'élongation antisymétrique de la liaison COC du groupe étherique.

Une bande d'amide III est observé vers  $1320\text{ cm}^{-1}$  et une band de  $\text{CH}_2$  envers  $1420\text{ cm}^{-1}$ . Deux autres bandes intéressantes se trouvent vers  $1083\text{ cm}^{-1}$  et  $1030\text{ cm}^{-1}$  qui correspondent à la structure saccharidique.

### III.1.2 Degré D'acétylations

L'analyse des spectres infrarouges du Chitosane a permet de déduire le DA selon la méthode proposé par (KHAN, et al., 2002). Le résultat était comme suit :

$$DA\% = 82\%$$

$$DDA\% = 18\%$$

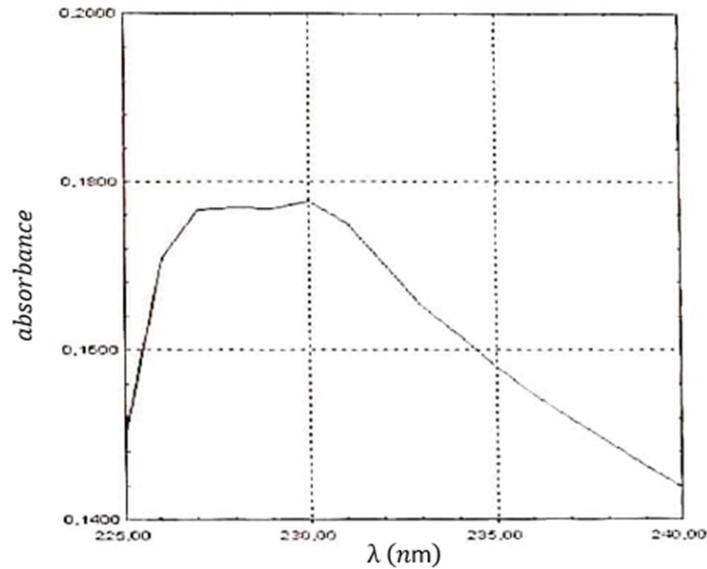
(Hartley, et al., 1965) ont observé dans le cas des MICI plus précisément la RCUH un déséquilibre dans la flore intestinal traduit par une réduction du nombre de bifido-bacterium et l'augmentation de la colonisation par E. Coli au niveau des zones malades pendant la poussé.

L'activité antimicrobienne du Chitosane varie en fonction de son degré de d'acétylation. Bien que l'activité antimicrobienne du Chitosane sur E. coli augmente en fonction du degré de d'acétylation (Liu, et al., 2006). (Park, et al., 2004) ont rapporté que le Chitosane ayant un degré d'acétylation de 75% a permis une meilleure activité antimicrobienne contre des bactéries Gram-positives et des bactéries Gram-négatives comparativement aux Chitosane avec un degré de d'acétylation de 50%. La majorité des études rapportées dans la littérature sur l'activité antimicrobienne du Chitosane porte sur l'effet de son poids moléculaire ou sur l'effet de son degré de d'acétylation. Cependant, peu d'études ont fait l'objet de la combinaison entre l'effet de différents degrés de d'acétylation et différents poids moléculaires du Chitosane sur des microorganismes pathogènes alimentaires tels que les L. monocytogènes. (*Listeria monocytogene* une pathogène présente dans l'intestin de 1 à 10% des humains).

### III.1.3 UV-VISIBLE

L'analyse spectrophotométrique UV-Visible a permet d'enregistrer l'absorbance en fonction des longueurs d'ondes du Chitosane dans la gamme de 200-400 nm (**Figure III-2**). Un pic d'absorbance maximal apparaît à 230 nm.

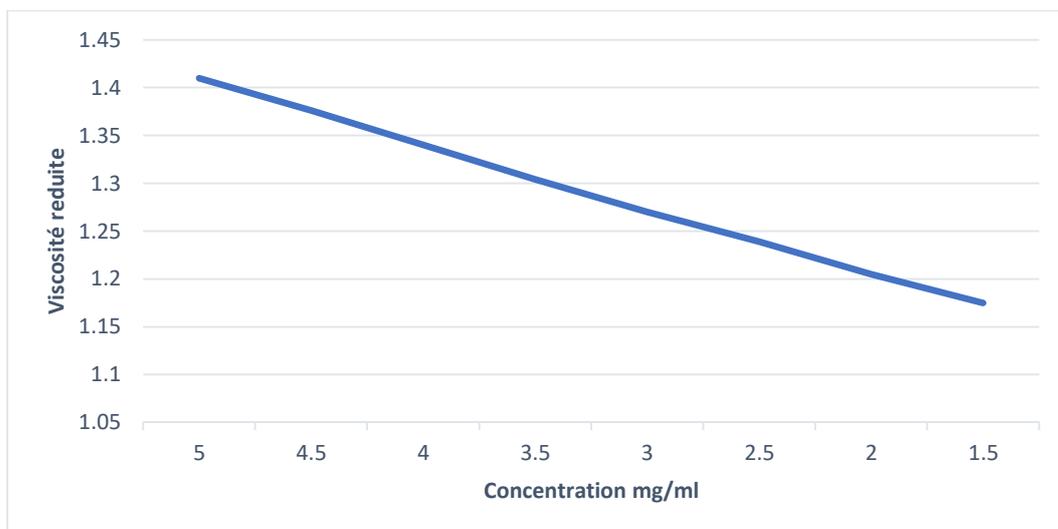
Une analyse UV-Visible mené par (Kumirska, et al., 2010) sur du Chitosane pure a permet d'avoir un pic d'absorption maximal a une longueur d'onde de 201 nm. Pendant qu'une autre étude faite par (Vijavalekshmi, 2015) le Chitosane a marqué un pic sur l'onde 260 nm.



**Figure III-2 :** Spectre UV-visible déterminant la bande d'absorption maximal du Chitosane.

### III.1.4 Le poids moléculaire

L'étude de la viscosité des échantillons dilués du Chitosane a donné la courbe illustrée dans la **Figure III-3** :



**Figure III-3 :** Courbe de Viscosité réduite.

En appliquant la formule de Mark-Houwink, le poids moléculaire obtenu était de 1.25 KD ce qui est un poids moléculaire très faible.

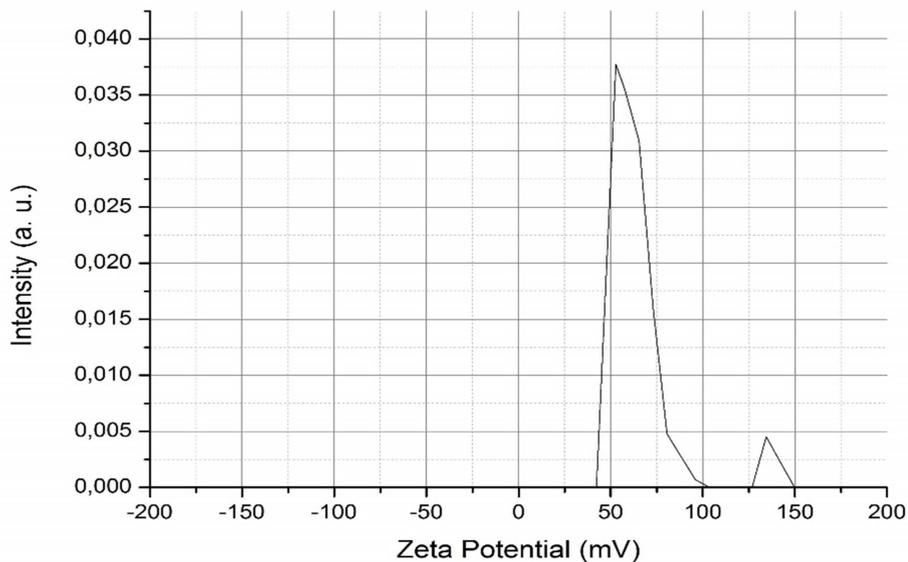
Une étude faite par (Benbbou, 2009) sur l'effet de trois Chitosane a des poids moléculaires différents (2, 20 et 100 KDa), et a un même DA (87.4 %) sur leur activité inhibitrice contre *L. monocytogenes*, une inhibition complète de *L. monocytogenes* a été obtenue pendant les 10 premières heures avec Chitosane à un poids moléculaire de 2 kDa, et dans 30heures avec le Chitosane a un poids moléculaire de 20 et 100 kDa.

Finalement, (Zheng, et al., 2003)ont rapporté que l'activité antibactérienne du Chitosane sur des bactéries Gram-négatives (*E. coli*) était plus marquée avec un Chitosane de faible poids moléculaire.

### III.1.5 Mesure du potentiel Zeta

Les mesures du potentiel Zeta ont été analysées pour comprendre l'effet de charge superficielle des particules de Chitosane.

La **Figure III-4** donne un pic représentatif du potentiel zêta de Chitosane obtenu à partir de l'analyse zétamétrique de ce polymère.



**Figure III-4** : mesure du potentiel zêta du Chitosane.

Les résultats de caractérisation Zetamétrique sont donnés sur le tableau suivant :

**Tableau III-1** : résultats de la caractérisation zétamétrique.

Pic N°	Potentiel Zeta	Mobilité électrophorétique
1	52.8	0.037746
2	53.4	0.016625
3	53.8	0.053249
<b>Moyenne</b>	53.3	0.035873

D'après cette étude, la mesure du potentiel zêta nous a permis de confirmer le caractère cationique du Chitosane et la valeur de son potentiel qui est de : 53.3 mv

Quand une particule chargée est suspendue dans un liquide, les ions de charge opposée à la charge de la particule sont attirés à la surface de la particule en suspension. Une particule de charge négative attire les ions positifs et inversement, une particule de charge positive attire les ions négatifs. (Briant, 1989) ; (Tadros, 1987) (Thomas, 2011).

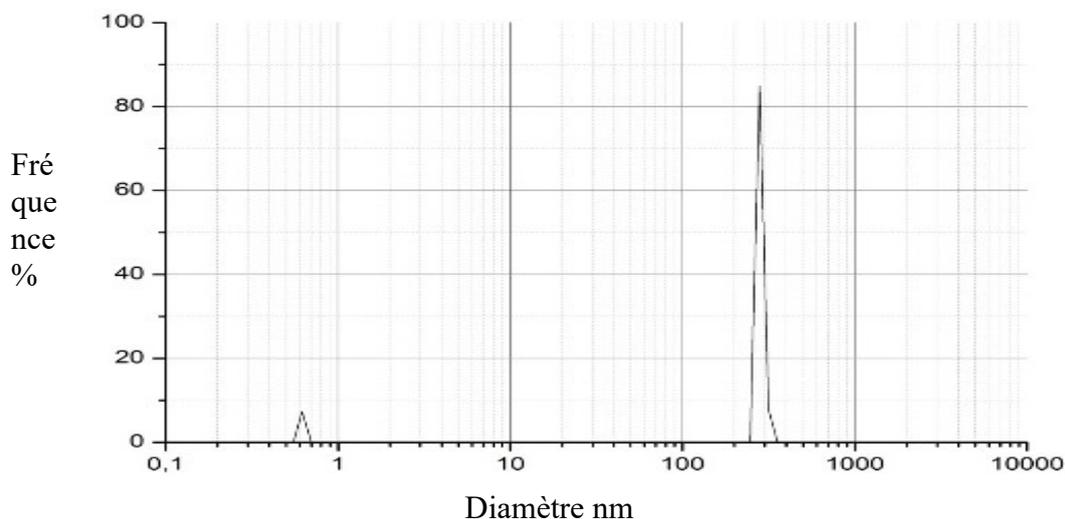
L'inflammation intestinale est accompagné d'une modification dans la composition du microbiote intestinal (dysbioses), l'altération majeure observé est l'augmentation des entérobactéries, une diminution des bifido-bactéries et la présence d'une forte densité des bactéries potentiellement pro-inflammatoire (*E. Coli* entéroadhérentes et entéroinvasives) cette dernière est une bactérie possédant une paroi chargée négativement (kaci, 2012 )

Un effet antibactérien du Chitosane a été signalé en raison de la densité élevée des groupes aminés  $-NH_3^+$  qui confère une charge positive au polymère, cette charge est représentée par le potentiel zêta. Elle attribuée à la formation de complexes polyélectrolytiques avec les peptidoglycanes négatifs de la paroi cellulaire bactérienne. Cette interaction peut perturber la paroi cellulaire et entraîner l'inhibition de la croissance bactérienne. (Sadeghi, et al., 2008), (Cruz-Romero, et al., 2013); (Krajewska, et al., 2011)

Il a été démontré aussi qu'une charge positive des particules est souhaitable pour empêcher l'agrégation des particules et favoriser l'interaction électrostatique avec la charge négative globale des cellules microbiennes (Qi, et al., 2004).Le Chitosane interagit avec la membrane des cellules pour altérer sa perméabilité entravant ainsi l'entrée de certains nutriments.

### III.1.6 Détermination de la taille des particules par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La taille des particules est importante pour une absorption cellulaire favorable. La taille des nanoparticules de Chitosane obtenus par l'analyse DLS apparait Sur la **Figure III-5**, elle est estimée de 246.0 nm.



**Figure III-5** : Analyse par DLS des particules de Chitosane.

Une étude menée par (H.Kastas, 2011) sur l'influence de la taille des particules du Chitosane sur son effet antibactérien. Les résultats ont montré que l'effet inhibiteur du Chitosane contre E. Coli et S.aurus, était influencé par la taille des particules. Un effet inhibiteur plus important était observé entant que nanoparticules.

Les particules plus petites ont une plus grande surface qui serait en contact avec les bactéries donc donnent une meilleure inhibition.

En ce qui concerne l'effet anti inflammatoire, les travaux de (D.vllasliu, et al., 2010)ont montré que les nanoparticules de Chitosane obtenus par gélation ionique induisent l'ouverture réversible des jonctions serrées des cellules épithéliales.

Dans le traitement des MICI, (Lamprecht, et al., 2001) ont montré les avantages de l'administration du PA sous la forme de nanoparticules. En effet, Les nanoparticules s'accumulent spécifiquement au niveau du site inflammatoire, le passage systémique du PA actif est moindre et par conséquent les effets secondaires sont moindres.

Dans les études précédentes, il a été démontré que le dépôt des particules le long de la muqueuse digestif dépendait de leur taille. (Lamprecht, et al., 2001), ont observé le même phénomène au niveau des zones inflammatoires, mais l'influence de la taille dans ce dernier cas était bien plus prononcée.

La fixation des systèmes particulaires est plus importante au niveau des zones inflammatoires actives et au niveau des zones ulcérées qu'au niveau des zones saines et la diminution du diamètre des particules permet très clairement une augmentation de leur fixation au niveau des zones inflammatoires. (MARIO, 2012)

### **III.2 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire du Chitosane**

Cette étude a été réalisée pour évaluer l'effet anti-inflammatoire du Chitosane issus des carapaces de crevette contre la colite induite chez des souris albinos.

Différents paramètres surveillés sur le model au cours de l'expérimentation permettent de mesurer le développement et la sévérité de l'inflammation intestinale induite par l'acide acétique (colites chimio-induites). Celle-ci se manifeste par la diminution de consommation de l'aliment ainsi que de l'eau, associée à une chute de poids. De plus l'acide acétique induit une modification progressive de la consistance des fèces allant jusqu'à la diarrhée caractéristique de la colite. L'inflammation se manifeste aussi par la présence de sang dans les selles au niveau anal. Ainsi qu'au niveau de la paroi des colons lors de leur récupération après sacrifice. Une augmentation significative du rapport P/L par rapport au lot témoin a été également observée. Notre travail a été conçu pour évaluer l'activité anti-inflammatoire du Chitosane pendant 6 jour chez le model murins.

#### **III.2.1 Observation macroscopique**

Les souris qui ont été utilisées dans cette étude, ont développé une inflammation colique suite à l'administration de l'acide acétique, caractérisée par une perte de poids corporel, sang dans les fèces, diarrhées, irritations dans l'anus et des hémorragies. **Figure III-6** Par la suite, nous avons remarqué également des changements comportementaux (immobilisation des souris dans les coins des cages, accompagnée d'une réduction de leurs activités, d'une diminution de la prise de nourriture et un feutrage de forure due à la déshydratation).

Les souris du lot témoin qui n'ont pas été traitées par l'acide acétique, n'ont pas présenté des changements physiologiques précis, ce qui prouve que les symptômes retrouvés chez le groupe contrôlent ont été bien induites.

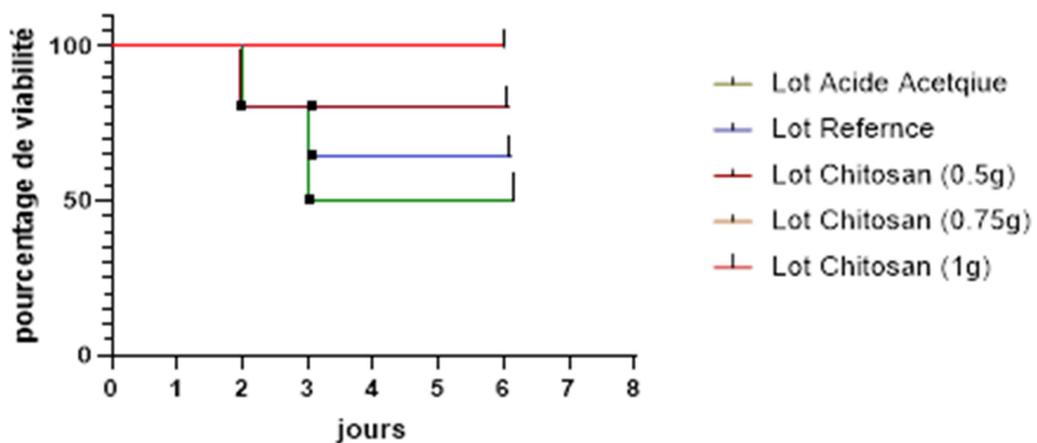


**Figure III-6:** Observations macroscopiques des dommages causés par l'induction de l'acide acétique.

### III.2.2 Evaluation macroscopique de l'effet doses du Chitosane sur la RCUH

#### III.2.2.1 Le pourcentage de viabilité

Le nombre de souris est comptabilisé chaque jour pour chaque lot et le pourcentage de viabilités des six lots pendant les 6 jours est représenté sur la **Figure III-7** :



**Figure III-7:** Pourcentage de viabilité des souris des 6 lots pendant 6 jours.

Selon la **Figure III-7**, une perte de la moitié de la population du lot traité avec l'acide acétique seulement au bout du 3eme jour cela est dus à la sévérité de l'inflammation et l'absence du traitement.

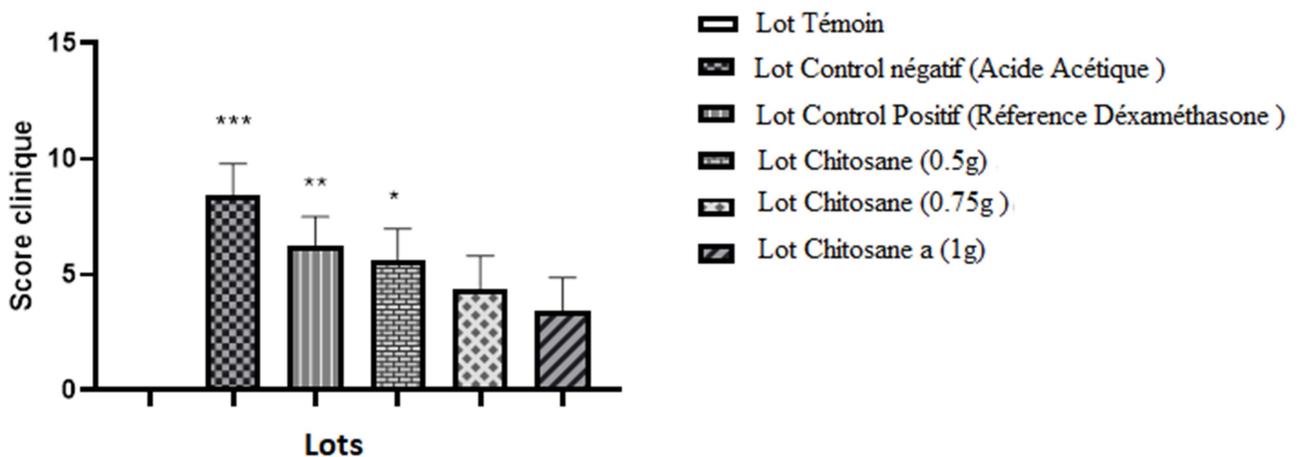
Pour le Lot référence traité avec la Dexaméthasone après l'induction des colites avec l'acide acétique on a signalé la mort de 33.33% des souris équivalent de 2 souris au bout du troisième jour à cause de l'inflammation aigue et la non-efficacité du traitement donné.

La perte de 16.66% des souris du lot traité avec 0.5 g de Chitosane équivalent d'une souris au bout du 2eme jour du a l'importance des dommages causés par l'acide acétique et la dose insuffisante du Chitosane.

Aucune mort n'a été signalée chez les deux lots traités avec 0.75g et 1 g de Chitosane respectivement preuve de l'efficacité du Chitosane contre les colites et sur la baisse de l'inflammation.

### III.2.2.2 Indice d'activité de la maladie

Dans notre étude on a utilisé le modèle d'évaluation du score de (Cooper, et al., 1993), qui indique les dommages causés par l'induction de l'acide acétique, la sévérité de la RCUH et le degré de l'inflammation. Les scores obtenus ont été représenté sur la **Figure III-8**.

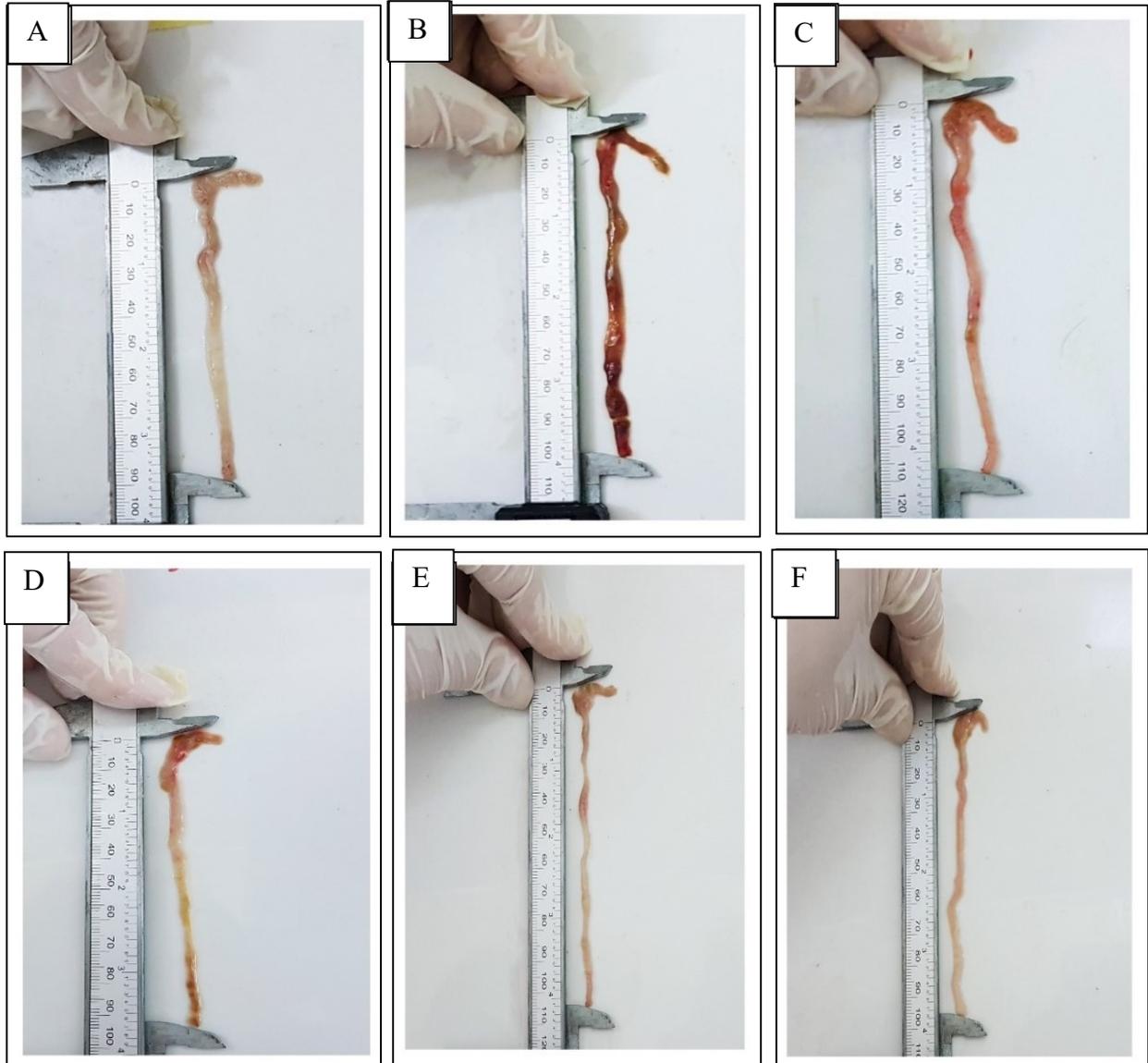


**Figure III-8** : Score clinique selon (Cooper, et al., 1993).

### III.2.2.3 Score macroscopique d'ulcération :

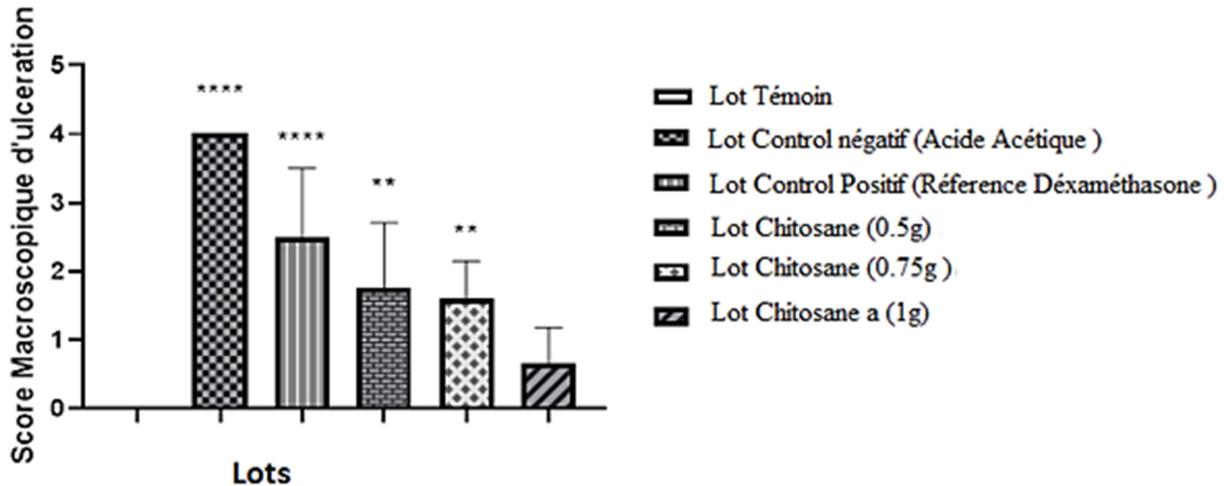
L'apparition des ulcères ainsi les autres atteintes macroscopiques observés lors de la récupération des colons, en comparaison avec les souris du lot témoins non colique, lot

control négatif, lot référence et celles des lots traités par la solution du Chitosane a des différentes doses est représenté sur les photos de la **Figure III-9**.



**Figure III-9** : Observations macroscopique des colons récupérés, A): Lot Témoin ;B):Lot control négatif ;C): lot control positif (Dexaméthasone) D):Lot CS 0.5g ;E):Lot /CS0.75g/ F):Lot CS 1g.

L'observation des colons récupérés a permet de mieux comprendre les scores cliniques, ainsi qu'obtenir les scores d'ulcération selon (Deshmukh C.D., 2010).**Figure III-10**



**Figure III-10** : Score macroscopique d'ulcération.

Un score clinique de  $(0,00 \pm 0,00)$  **Figure III-8a** été révélé chez les souris du groupe témoin, cela est justifié par un colon sain, dans lequel aucun changement morphologique ni inflammation n'a été montré **Figure III-9.A** et aucune ulcération n'a été observée **Figure III-10**.

En revanche, pour les souris du groupe contrôle négatif (Lot acide acétique) Une diarrhée aiguë a été observée chez ce groupe, résultant probablement de l'érosion et de l'altération de la muqueuse et l'apoptose des cellules épithéliales du côlon dont le rôle principal est la réabsorption d'eau. Cette fonction physiologique n'est plus assurée, l'eau et les électrolytes ne sont plus absorbés ; ce qui se traduit par l'évacuation permanente des selles et la modification de leur consistance (diarrhée) (Schulzke, et al., 2006). Des scores de  $(8.45 \pm 1.33)$  ont été notés, correspondant à une 'inflammation aiguë, ( $P < 0,001$ ) par rapport au groupe témoin. **Figure III-8**.

Les observations macroscopiques des côlons prélevés ont révélé des saignements rectaux dus à une hémorragie de la partie inférieure du tube digestif (réctorragie). Ceci est probablement dû aux lésions provoquées par l'acide acétique comme le montre la **Figure III-10.B**. Ces lésions ont déclenché une réaction inflammatoire débutée par un signal d'alarme, notamment la dilatation des vaisseaux sanguins au niveau de la zone lésée, de façon à permettre un apport massif de globules blancs nécessaires à la défense immunitaire (Stevens, 2004). Conduisant ainsi l'augmentation de l'afflux sanguin, responsable de

l'apparition d'immenses dommages épithéliaux (Yougbaré-Ziébro, et al., 2015)**Figure III-9B** Un taux d'ulcération maximal a été enregistré ( $4 \pm 0$ )**Figure III-10**.

Les souris du contrôle positif, traitées par le médicament de référence « Dexaméthasone » à une dose de 100mg/kg, ont révélé un score macroscopique de ( $6.26 \pm 1.23$ ) ( $P > 0,01$ ) **Figure III-8** par rapport au groupe Control négatif ( $8,45 \pm 1,33$ ), qui se manifeste par une diminution de diarrhée et arrêt de saignement ,dévoilant ainsi une légère amélioration de l'état de la muqueuse colique, cette amélioration est traduite par une baisse de l'intensité de l'inflammation y compris la rougeur **Figure III-9.C** ainsi qu'une baisse légère dans le taux d'ulcération mais non significative **Figure III-10**.

Les traitements des souris avec les trois doses de Chitosane, 0.5g/kg ,0.75g/kg et 1g/kg, dévoilent respectivement les scores cliniques suivants ( $5.62 \pm 1.33$  ;  $4.36 \pm 1,44$  ;  $3,41 \pm 1,45$ ) **Figure III-8**.

Les souris du groupe CS à 0.5g/kg ont marqué une légère amélioration illustrée par une disparition de diarrhée et l'apparition des selles molles, arrêt de saignement et récupération de l'activité et du poids ainsi que l'amélioration de l'état de pelage. A l'échelle macroscopique le Chitosane à 0.5 g/kg n'a pas pu supprimer complètement les symptômes et les dommages causés par l'acide acétique dans les muqueuses épithéliales, on remarque une amélioration meilleure que celle de la référence ou une disparition de la rougeur et de gonflement a été observé par la suite une diminution importante de l'inflammation **Figure III-9.D** ainsi un taux d'ulcération réduit par rapport aux lots control négatif et positif **Figure III-10**.

En analysant les résultats acquis, on constate que les deux doses restantes (CS 0.75g et CS 1g) ont révélé des résultats très proche avec une légère différence entre eux ainsi qu'une amélioration très significative par rapport au lot de control négatif et lot de control positif. Cette amélioration est traduite par une disparition totale de la diarrhée et du saignement et retour à l'état normal, les souris ont récupéré du poids **Figure III-8** ainsi que leur activité et mobilité dans les cages notamment leur état de pelage.

L'observation des colons a révélé des colons moins touchés par les lésions intestinales. Pour le lot CS 0.75 absence totale de saignement et diminution significative de rougeur **Figure III-9.E** avec une moyenne d'ulcération réduite par rapport aux lots précédents **Figure III-10**.

Pour le lot de CS 1g des colons sains avec absence totale de rougeur et de saignement ce qui signifie une disparition de l'inflammation et guérison **Figure III-9.F** en comparaison avec l'état normal (témoin sain) **Figure III-9.A** et l'état malade (Control négatif) **Figure III-9.B** aussi le taux d'ulcération était très significativement réduits et en voie de disparition. **Figure III-10**

#### III.2.2.4 L'effet des différentes doses de Chitosane sur le poids et la longueur des colons

Après le sacrifice, les colons ont été récupérés, pesés et mesurés pour calculer le rapport Poids/ Longueur (P/L), qui est indicateur de l'étendue de l'inflammation colique (SOTNIKOVA Ruzena, et al., 2013) et les résultats ont révélé une diminution de la longueur des colons et une augmentation de leur poids, en comparaison avec les souris du lot témoins, et les cinq autres lots traités avec l'acide acétique puis avec les différentes molécules. Les résultats sont notés sur le **Tableau III-2** puis présenté sur le diagramme de la **Figure III-11**.

**Tableau III-2:** moyenne des poids, longueurs, et rapport poids/longueurs des colons récupérés

Lot	Longueur (Cm)	Poids (mg)	P/L
Témoin	11.50 ±0.58	514.8±32.30	44.89±2.30
Control négatif	8.52 ±0.35	656.7±39.06	76.09±7.50
Référence (DEX)	9.52±0.57	579.0±51.92	61.61±7.82
CS 0.5 g	9.59±0.16	572.8±77.53	57.56±10.02
CS 0.75 g	9.74±0.52	530.7±41.17	54.20±4.10
CS 1 g	10.45±0.27	523.0±28.31	51.11±3.45

Le lot traité avec l'acide acétique montre une diminution remarquable dans sa longueur du colon (8.52 ±0.35) ainsi qu'une augmentation dans son poids (656.7±39.06) avec un rapport P/L de (76.09±7.50) par rapport au témoin sain non traité avec l'acide acétique (44.89±2.30). **Erreur ! Source du renvoi introuvable. Figure III-11**

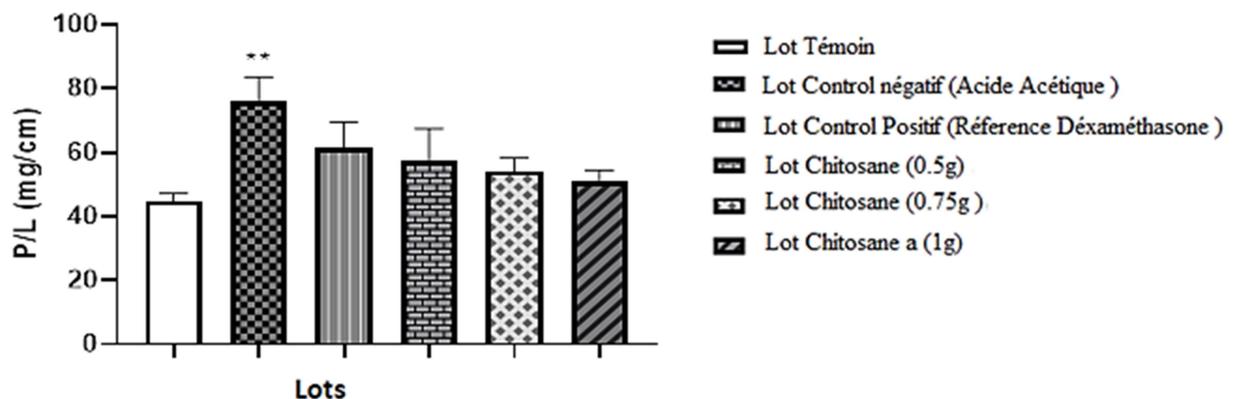
Le traitement avec le Dexamethasone (DEX 1mg/kg) a montré une amélioration de la longueur du colon et une réduction légère du rapport P/L (61.61±7.82) qui a été observé par

rapport au groupe acide acétique ( $76.09 \pm 7.50$ ), cela révèle que le DEX a un impact positif sur l'inflammation colique mais pas significatif.

L'administration des doses (0.5, 0.75 et 1g/kg) du Chitosane (pendant 6 jours) par gavage prévient de façon significative. L'amélioration de la longueur et du poids du colon et une diminution significative du rapport P/L est remarquablement significative chez le lot traité avec la dose (1g/kg) du Chitosane ( $51.11 \pm 3.45$ ), par rapport au lot traité avec la dose (0.75 g/kg) et (0.5 g/kg), ( $54.20 \pm 4.10$ ) et ( $57.56 \pm 10.02$ ) respectivement. Cette réduction du rapport P/L assurée par la dose de (1 g/kg) est significative en comparaison avec elle du lot malade non traité. **Figure III-11, Erreur ! Source du renvoi introuvable..**

La longueur du côlon est un autre paramètre affecté lors de la rectocolite ulcérohémorragique. Le passage à la chronicité de la maladie entraîne un raccourcissement du côlon suite à l'apoptose des cellules épithéliales et l'altération de leur fonction proliférative (Topcu-Tarladacalisir, et al., 2013).

Le poids du tissu colique est considéré comme un indicateur fiable et sensible de la sévérité et de l'étendue de l'inflammation intestinale (Somani, 2014).



**Figure III-11 :** Rapport poids /longueurs des colons récupérés.

Les résultats obtenus avec le groupe de souris malades (Colite) traitées par l'acide acétique révèle la présence d'une inflammation aiguë à cause de la relation inverse qu'il y'a entre la longueur et le poids du colon par rapport au lot témoin. Cela est dû à l'envahissement du site de l'inflammation par des cellules et médiateurs tels que les cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6, IL-8, et  $TNF\alpha$ , ce qui a augmenté la masse corporelle du colon ainsi son raccourcissement qui est due aux nécroses, lésions et œdèmes. De ce fait, le rapport

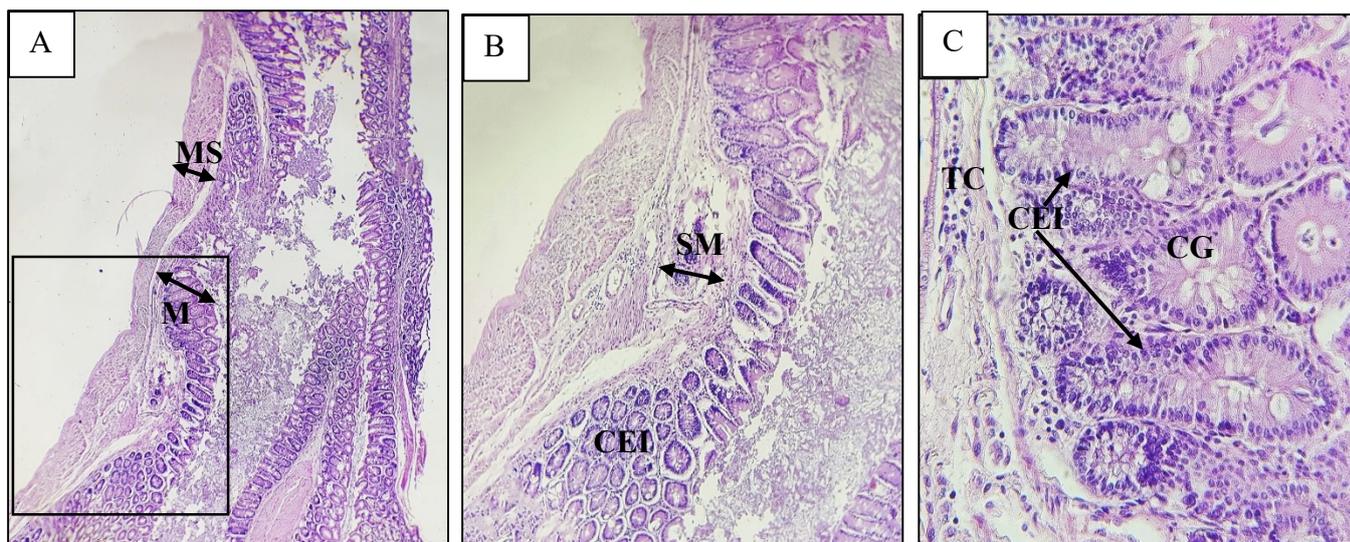
poids / longueur est plus élevé dans le groupe colique témoin par rapport au groupe non colique. **Figure III-11.**

Le traitement des souris coliques avec les doses 0.5 ; 0.75 ; 1g /kg de Chitosane a provoqué une diminution du rapport P/L proche à celui obtenu avec le lot traité par le médicament de référence, ce qui nous a permis de noter son effet anti-inflammatoire qui a réduit l'état clinique et les dégâts macroscopiques induits par l'acide acétique. Mais les résultats du rapport P/L et les observations macroscopiques **Figure III-9**, révèlent un effet meilleur de la dose 1g/kg que les deux autres doses et que le médicament de référence. Ce qui nous permet de suggérer que le Chitosane possède des propriétés anti-inflammatoires intestinales et que la dose de 1g/kg était meilleure et plus efficace, et a montré une réduction significative du IAM, en tout une amélioration de l'état clinique des souris.

### **III.3 Observation microscopique (étude histologique)**

Dans le but de confirmer les résultats obtenus lors des observations macroscopiques des côlons, une étude histologique a été réalisée sur les échantillons prélevés a permis de mieux évaluer l'activité anti-rectocolite du Chitosane, comparée à celle du médicament de référence. Cette évaluation s'est basée sur le changement architectural de la muqueuse, l'infiltration des neutrophiles, la destruction des cryptes et la régénération des cellules.

La **Figure III-12a** montré que, chez le Témoin, aucun dommage histologique n'a été révélé. La paroi colique était intacte, bien régulière, bien différenciée et les signes d'inflammation ou de nécrose n'ont pas été observés.



**Figure III-12 :** Microphotographie de la section histologique du fragment du côlon des Souris du Lot Témoin, A) G×10. B) G×40, C) G×100.

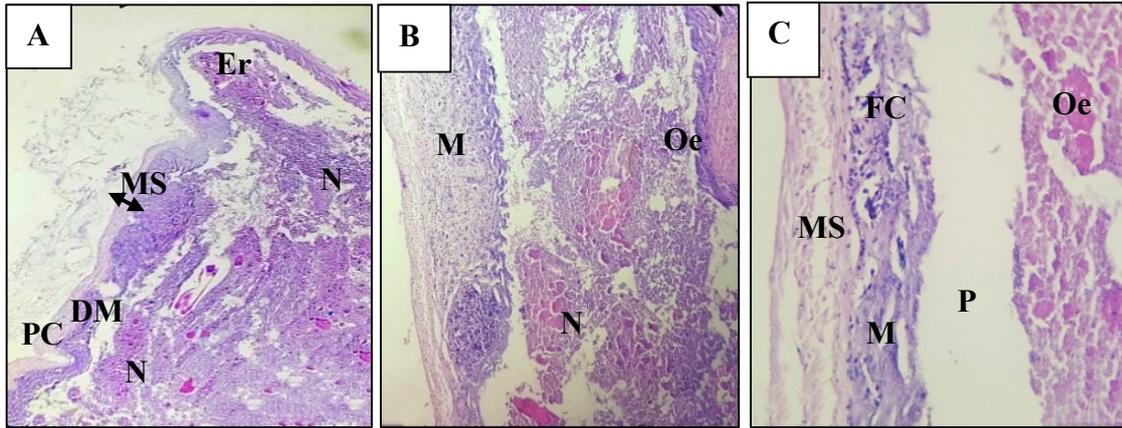
**CG :** Cellules de Gobelet ; **CEI :** Cellules épithéliales intestinales ; **M :** muqueuse, **SM :** musculuse ; **TC :** Tissu conjonctif.

En revanche, une RCUH active et diffuse a été retrouvée chez le groupe Control négatif n'ayant reçu aucun traitement L'évaluation morphologique de la forme des colons a montré Des changements pathologiques représentés par une désorientation morphologique étendue et une paroi colique largement abimée **Figure III-13.A** une perte de crypte dus à la vasodilatation et l'augmentation de l'afflux sanguin local, des œdèmes sous muqueux causent l'augmentation de la pression sanguine et la perméabilité des capillaires (Stevens, 2004).

Une muqueuse largement nécrosée et ulcérée avec une présence d'un important infiltrat inflammatoire dense et polymorphe. **Figure III-13. B** On peut observer aussi la destruction des cellules et présence de quelque Fantômes cellulaire. **Figure III-13.C**

Cette infiltration est la résultante de la libération des médiateurs de l'inflammation (histamine, sérotonine...) qui activent l'endothélium vasculaire ce qui induit l'augmentation de la capacité adhésive des neutrophiles et facilite leur migration vers le site lésionnel (Stevens, 2004).

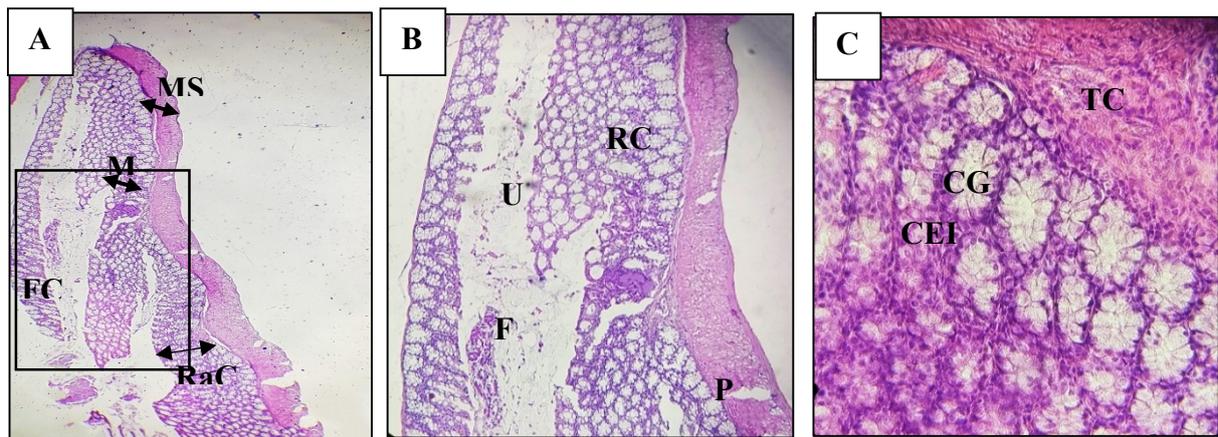
Ce qui prouve que l'acide acétique provoque une acidification intracellulaire massive entraînant une lésion des cellules épithéliales et une réponse inflammatoire induisant des dommages graves aux muqueuses et une l'infiltration cellulaire, (Otari, 2012) ; (Somani, 2014).



**Figure III-13 :** Microphotographie de la section histologique du fragment du côlon des Souris du Control négatif. A) G  $\times$  10 B) G $\times$ 40. C) G $\times$ 100, FC : Fantômes cellulaires ; Er : Erosion, DM : destruction de la muqueuse, M : muqueuse MS : musculueuse, PC : perte de crypte, N : Infiltrat inflammatoire ; Oe : œdème ; P:Prolifération.

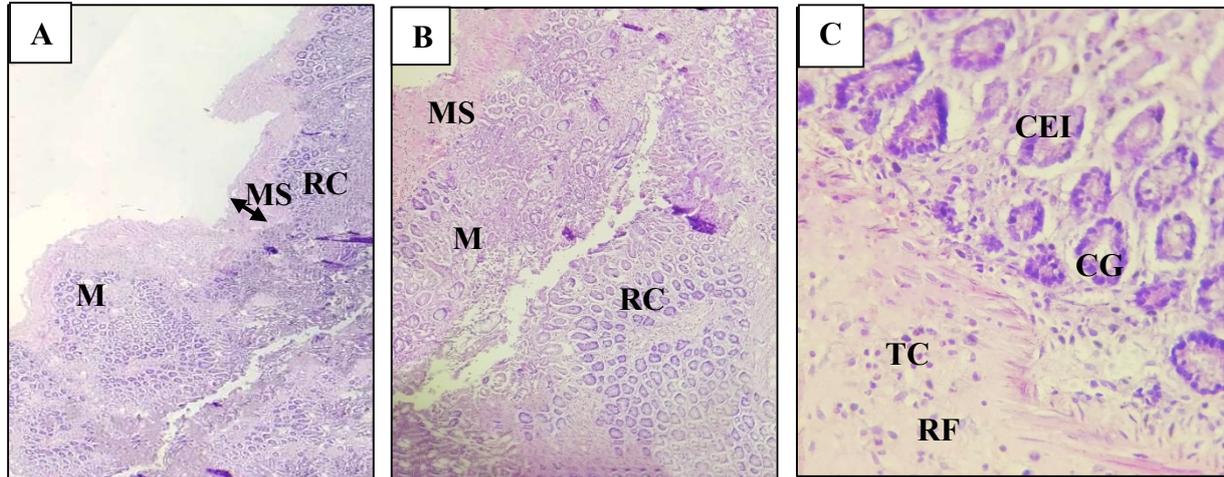
Par ailleurs, le traitement avec la Dexaméthasone n'a pas montré une réduction significative de la gravité des dommages mais seulement une récupération discrète de la surface de la muqueuse avec une légère régénération cellulaire. **Figure III-14.C** Les cryptes sont toujours de forme raccourcie et moins nombreuses. **Figure III-14.A** aussi présence de quelque prolifération, des foyers inflammatoire et quelque fantôme cellulaire **Figure III-14B**

Ceci fournit une preuve que la Dexaméthasone baisse l'inflammation mais ne traite pas d'une manière efficace l'origine de la maladie, elle agit uniquement par l'atténuation des symptômes.



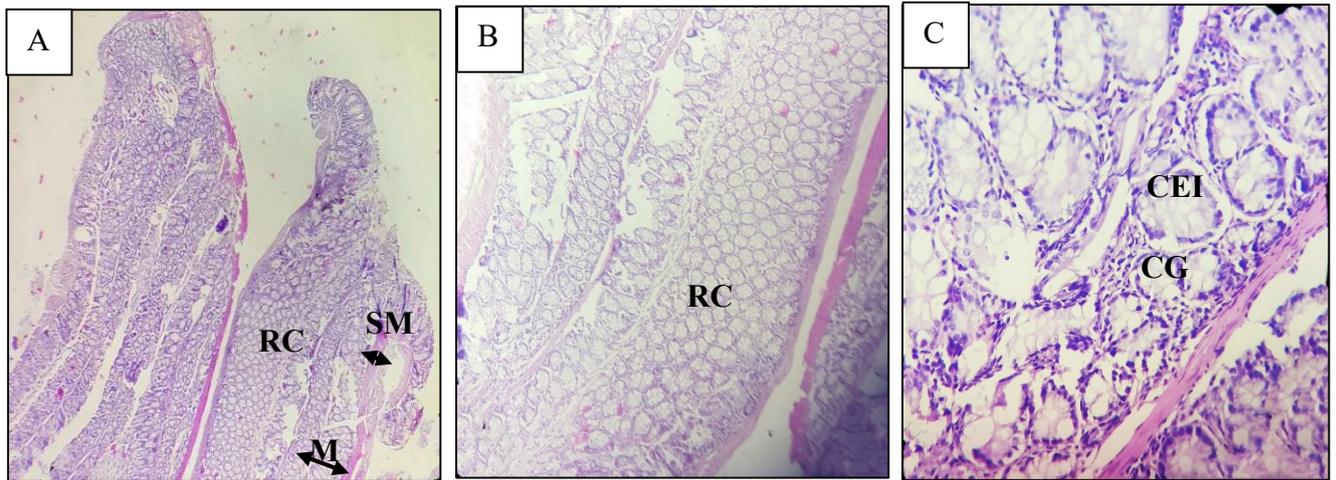
**Figure III-14 :** Microphotographie de la section histologique du fragment du côlon des Souris du Control Positif (Lot traité par la Dexamethasone). A) G  $\times$  10 B) G $\times$ 40. C) G $\times$ 100.FC : Fantôme cellulaires ; M : muqueuse, MS : musculueuse, RaC : Raccourcissement des cryptes, RC : régénération cellulaire, F : Foyer inflammatoire, U : ulcération, CEI : cellule épithéliale intestinal, CG : Cellules de Goblet, TC : tissu conjonctif.

La Erreur ! Source du renvoi introuvable. montre que les colons du groupe traité avec le Chitosane à une dose de 0.5 g/kg ont révélé une muqueuse d'aspect régénérative avec une reconstitution des cellules épithéliales et récupération des cellules de Goblet, avec un tissu conjonctif fibreux. Aussi une disparition de l'inflammation et des œdèmes avec quelque foyer de remaniement fibreux.



**Figure III-15 :** Microphotographie de la section histologique du fragment du côlon des Souris traité avec 0.5g de Chitosane, A) G  $\times$ 10 B) G $\times$ 40. C) G $\times$ 100, **CG** : Cellules de Gobelet ; **CEI**: Cellules épithéliales ; **RC** : régénération cellulaire, **M** : muqueuse, **MS** : muscleuse, **TC** : tissu conjonctif. **RF** : remaniement fibreux.

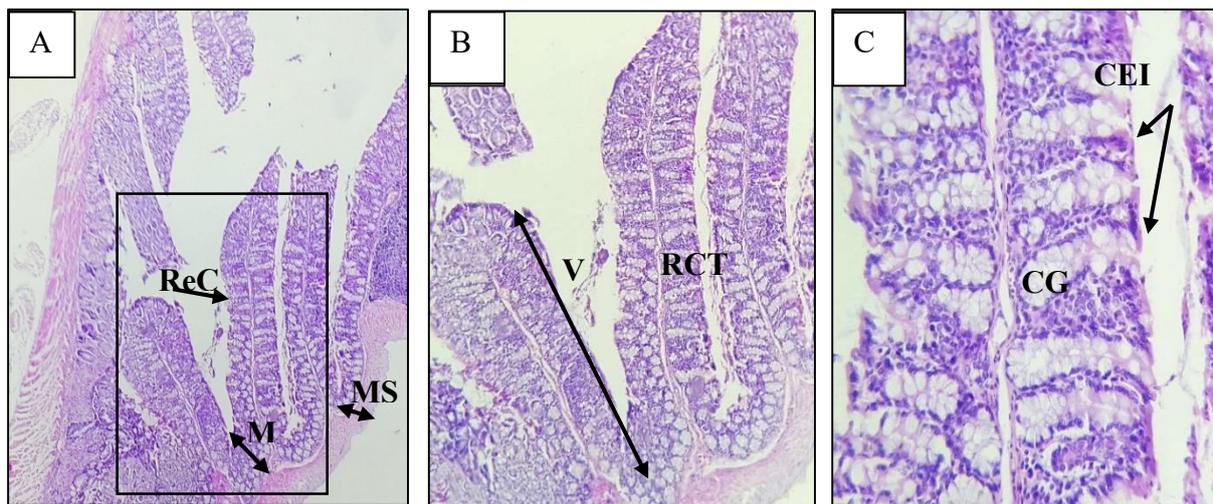
Les souris traitées avec le Chitosane à une dose de 0.75g ont montré une diminution significative des dégâts de cette inflammation colique qui se traduit par une disparition des œdèmes et une récupération remarquable de la muqueuse **Figure III-16.A** De plus, les cellules caliciformes (Cellule de Goblet). Des foyers régénératifs ont pu être observés ainsi une reconstitution cellulaire. **Figure III-16.C**



**Figure III-16** : Microphotographie de la section histologique du fragment du côlon des Souris traités avec 0.75 g de Chitosane. A) G  $\times$ 10 B) G $\times$ 40. C) G $\times$ 100

**CG** : Cellules de Gobelet ; **CEI** : Cellules épithéliales intestinal ; **RC** : régénération cellulaire, **M** : muqueuse, **SM** : sous muqueuse.

Pour le lot traité avec une dose de 1g de Chitosane l'évaluation microscopique a révélé une réduction totale des dommages coliques. Le tissu a récupéré son aspect régulier, bien différencié, **Figure III-17.A** semblable à l'aspect normal de la paroi colique retrouvé chez le témoin non traité avec l'acide acétique. Une reconstitution remarquable des cellules épithéliales ainsi que les cellules caliciformes **Figure III-17.C**, les cryptes et les villosités sont de retour et reprennent leurs dimensions normales. **Figure III-17.**



**Figure III-17** : Microphotographie de la section histologique du fragment du côlon des souris traité avec 1g de Chitosane, A) G  $\times$ 10 B) G $\times$ 40. C) G $\times$ 100,

**M** : muqueuse, **MS** : musculature **CG** : Cellules de Gobelet ; **CE** : Cellules épithéliales intestinal ; **RCT** : régénération cellulaire total, **ReC** : récupération des cryptes, **V** : villosités.

Ce résultat suggère que la dose de 1g/kg du Chitosane à un effet anti-inflammatoire meilleur que la dose de 0.5g ainsi qu'à celui de la dose de 0.75g qui est proche de celui assuré par le médicament de référence (Dexaméthasone). Ce résultat correspond étroitement au résultat obtenu dans l'observation morphologique et l'évaluation des scores.

### III.4 Fabrication des capsules

Des capsules de taille 0 à base de gélatine contenant du Chitosane comme principe actif comme montre le **Tableau III-**.

**Tableau III-3** : Contenant de la gélule.

Composant	Quantité	Fonction	Référentiel
Chitosane	166mg	Substance Active	/

### III.5 Control qualité des capsules

Les capsules fabriquées doivent répondre à tous les normes et conditions de conformité exigées par la pharmacopée. C'est pour cela que les control suivants sont effectués.

#### III.5.1 Control de l'aspect

Le control visuel a révélé :

Des gélules de taille n°0, de couleur variable (corps blanc jaunâtre et tête orange), contenant une poudre sensiblement blanche (poudre de Chitosane). La granulométrie de cette poudre est de 100 micromètres.

#### III.5.2 Identification du Principe actif

L'identification de la substance utilisée comme principe actif (le Chitosane) a été déjà faite par spectrophotométrie infra-rouge a transformé de fourrier lors de l'étape de caractérisation de la molécule. Les bandes suivantes sont observées :

**Tableau III-3** : principe bande d'absorbance du Chitosane utilisé en comparaison avec un Chitosane commercial par infrarouge.

Bande d'absorbance (Cm-1)		Attribution
Chitosane utilisé	Chitosane commercialisé	
3430	3429	Elongation de la liaison O-H
2920	2920	Vibration d'élongation des liaisons C-H.
1650	1651	Vibration de déformation de N-H dans le plan
1419	1417	Vibration de déformation de CH <sub>2</sub> asymétrique
1377	1378	Vibration d'élongation de la liaison C-N
1320	1319	Bande d'amide III
1257	1254	Vibration d'élongation de la liaison C-N
1154	1153	Elongation antisymétrique C-O-C
1083 et 1030	1083 et 1029	Vibration de balance C-OH correspond à la structure saccharide

### III.5.3 Poids moyen et uniformité de poids

L'analyse de l'uniformité de poids été réalisé selon la méthode décrite dans la pharmacopée. Le calcul de l'écart est fait à l'aide d'EXCEL, et les résultats sont illustrés sur le **Tableau II-6**.

**Tableau III-5** : Les résultats de pesée du test d'uniformité de masse

Poids de la capsule (mg)	Capsule vide (mg)	Quantité (mg)	Ecart
256	95	161	-2%
255	90	165	0%
254	89	165	0%
250	87	163	-1%
249	90	159	-4%
252	82	170	3%
258	93	165	0%
257	89	168	2%
263	95	168	2%
252	91	161	-2%
250	89	161	-2%
258	91	167	1%
260	95	165	0%
261	93	168	2%
257	90	167	1%
255	91	164	-1%
262	96	166	1%
256	89	167	1%
259	91	168	2%
252	88	164	-1%

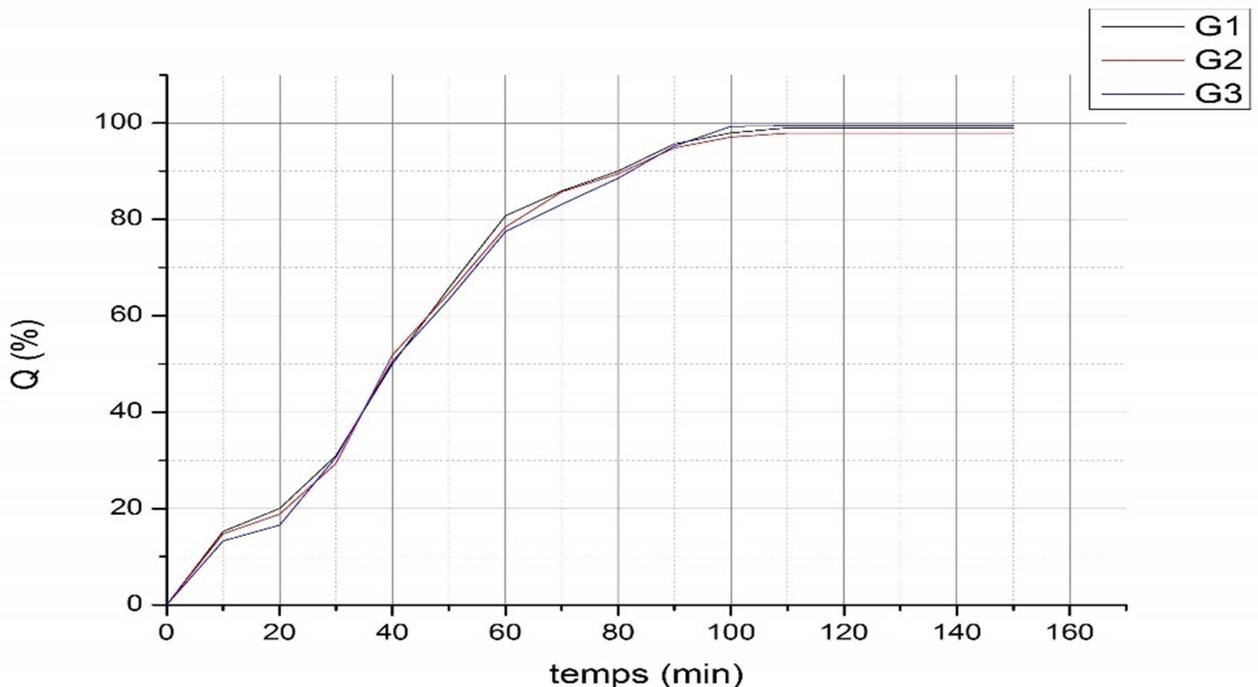
En tenant compte de la masse du contenu qui ne dépasse pas 300mg, la masse de la gélule ne doit pas s'écarter de la masse moyenne de +/- 10%. Les résultats de notre de test ont montré un écart maximal de - 4% et de + 3%, ce qui ne dépasse pas les +/- 10%. Ce test est conforme par rapport à la norme citée dans la pharmacopée européenne 9<sup>ème</sup> édition.

### III.5.4 Test de désintégration

Le test désintégration été fait selon la méthode proposé par la pharmacopée à l'aide d'un désintégrateur ou le temps de désintégration des 6 gélules ne doit pas dépasser les 30minute. Le temps de désintégration est estimé de 8 minutes et 20 secondes le corps de la capsule à complètement disparu et le principe actif s'est libéré.

### III.5.5 Essai de dissolution

A partir des résultats obtenus de la dissolution, le profil de cinétique de libération du Chitosane semble ne pas être de type à libération immédiate, à l'image du profil de dissolution d'un gel comme présente la **Figure III-18**. Sur ce profil, il apparait clairement que la quantité de médicament libérée ( $Q(t)$ ) évolue sur une échelle de temps ayant minutes comme unité et que le processus ne commence à s'achever qu'au-delà d'une heure et demie. La modélisation de ce comportement de cinétique par le modèle de Weibull, où la valeur de  $Q_{\infty}$  a été prise à sa valeur maximale de 100%, montre les différents  $Q_{\max}$  (quantité maximal libérée) des trois gélules prises pour l'essai de dissolution **Tableau III-4**.



**Figure III-18** : Profil de dissolution typique des essais de dissolution avec  $Q_{\infty} = 100\%$ ,  $T=37^{\circ}\text{C}$ . **G1** : Gélule 1 **G2** : Gélule 2 **G3** : Gélule 3.

**Tableau III-4** : Quantité maximal d'absorption dans les trois gélules.

Gélules	Q max %
1	98.98
2	97.86
3	99.45
<b>Moyenne :</b>	98.76
<b>Ecart</b>	0.06

Le pourcentage de dissolution des trois gélules du Chitosane 166mg après les 110min est d'une moyenne de 98.76 %, cette valeur est supérieure à 75%, selon la norme de la pharmacopée européenne 9<sup>ème</sup> édition, le résultat est conforme, et la libération est du type retardée.

## Discussion

Les souris sont le modèle animal le plus couramment utilisé pour les études intestinales, car leur développement intestinal est relativement similaire à celui de l'intestin humain et elles ont les mêmes réponses immunitaires, c'est un atout crucial pour évaluer les activités anti-inflammatoires intestinales des extraits et des substances bioactives et les mécanismes de l'inflammation intestinale aiguë et subaiguë (Jiminez, et al., 2015)

Dans notre étude, la colite a été provoquée par l'instillation rectale de l'acide acétique. Ce modèle bien établi est proche dans son mécanisme pathogène des MICI chez l'humain, c.-à-d. la perturbation de la barrière épithéliale induisant une réponse inflammatoire muqueuse exagérée. En perturbant la barrière épithéliale intestinale (qui permet l'exposition des cellules immunitaires aux bactéries lumineales), L'instillation rectale de l'acide acétique induit une érosion importante de l'épithélium colonique, ce qui entraîne des lésions intestinales aiguës et une inflammation subséquente. (Elson, et al., 1995), (Jurjus, et al., 2004); (Cetinkaya, et al., 2005).

Les diarrhées aiguës causées par l'induction d'acide acétique, sont dues à une diminution voire même une incapacité du colon à effectuer son pouvoir d'absorption d'eau, des électrolytes et des sels minéraux. Ce trouble fonctionnel est causé par la lésion de la barrière épithéliale résultant de phénomène de l'apoptose (mort programmée des cellules), systématiquement relatif avec l'augmentation les taux du TNF- $\alpha$  (facteur de nécrose) dans le siège de l'inflammation (Touboul, 2007).

Les caractéristiques d'une inflammation tel que la rougeur, le gonflement, la douleur et la chaleur ont été observés chez les souris traitées avec de l'acide acétique. Ces caractéristiques sont les principaux événements d'une réaction inflammatoire qui résultent de la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité capillaire et la migration des macrophages au site infecté à travers la paroi endothéliale, par le phénomène de diapédèse, afin de stimuler la production des médiateurs pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, et TNF $\alpha$ ). C'est ainsi que nous expliquons les observations des dégâts macroscopique et microscopique engendrés par l'acide acétique sur les colons des souris traitées et l'augmentation du rapport P/L.

Des études ont mis en évidence que le stress oxydatif pourrait être le facteur majeur des lésions tissulaires et de la fibrose associée à une réaction inflammatoire pathologique, ce qui

caractérise ce genre de maladies intestinales, avec des niveaux élevés en oxyde nitrique (NO) pendant la colite ulcéreuse. Cela augmente la formation de peroxy-nitrites qui favorisent l'oxydation des lipides. L'augmentation de la capacité de peroxydation lipidique due au changement dans l'état d'oxydation, conduit à l'érosion de la muqueuse, la distorsion et la perte des cryptes ainsi qu'une diminution de la capacité de défense antioxydante du système immunitaire (SOTNIKOVA Ruzena, et al., 2013), , (VinodPrabhu, 2013). (Bounihi, 2016) (Krishnan et al. 2014).

Les MICI sont associées à une perturbation de la flore bactérienne dans l'intestin (le microbiote intestinal). En contact permanent avec le mucus et les cellules épithéliales intestinales, ce dernier exerce probablement un rôle majeur dans la survenue des lésions intestinales.

Effectivement, il semble actuellement bien établi qu'au cours des MICI, la microflore joue un rôle délétère pro-inflammatoire.

De nombreux arguments cliniques et expérimentaux illustrent ce fait. La présence d'une microflore dans le côlon aggrave toutes les colites expérimentales chez l'animal et chez l'homme, la topographie des lésions préférentielle iléale et colique représente les segments ayant les concentrations bactériennes les plus élevées.

Des études moléculaires ont permis de mettre en évidence certaines anomalies du microbiote intestinal au cours des MICI telles que :

Une forte instabilité du microbiote au cours du temps, la présence d'environ 30 % de bactéries inhabituelles et une augmentation de la concentration bactérienne muqueuse. Comme l'*Escherichia. Coli*. Dans le cas de la RCUH. (Elodie, et al., 2012)

Les observations sur le lot traité par le médicament de référence sont interprétées par le pouvoir anti-inflammatoire de la Dexaméthasone. Ce corticoïde (glucocorticoïde) dérivé de la synthèse de l'hydrocortisone (ou cortisol) a un léger impact positif sur l'inflammation colique due à la lipocortine-1 qui est l'une des protéines dont la production est engendrée par le Dex. Le mécanisme par lequel le Dexaméthasone exerce son pouvoir anti-inflammatoire se résume en cette protéine qui bloque la production de la phospholipase A2, substance participant à la survenue de réactions inflammatoires. De plus le Dex provoque la rétention de NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme (Lee, et al., 2017).

Mais les avantages de la corticothérapie dans les maladies inflammatoire de l'intestin doivent être mis en balance avec les risques d'effets indésirables à court et à long terme tels que : le syndrome de cushing avec face lunaire, obésité centrale, ostéoporose, acné et œdèmes des membres inférieurs.... etc. (Turk Rhen, 2005).

En raison des effets néfastes des corticostéroïdes et de différentes classes médicamenteuses, les molécules qui traitent les MICI suscitent de plus en plus d'intérêt, les plus courantes sont les Biopolymères.

La présente étude a démontré que le Chitosane administré après l'induction de la colite s'est avéré particulièrement pertinent pour l'application dans le traitement de la rectocolite, car il a permis de réduire l'inflammation intestinale et de supprimer les dommages causés par cette dernière chez les souris ayant une inflammation intestinale aiguë, de plus une récupération de la muqueuse a travers une régénération de la paroi épithéliale a été observée après l'administration de ce biopolymère .

Cette constatation soutient les perspectives futures pour l'utilité thérapeutique du Chitosane dans le traitement des MICI.

(Yousef, et al.) Ont signalé que, Puisque le Chitosane est résistant à la dégradation par les enzymes digestives, ingéré il pourrait atteindre le côlon et fournir une protection contre la colite en agissant directement sur les Cellules Epithéliales Intestinales. Il a été démontré que les CEIs expriment des récepteurs de type Toll (par ex. TLR4) et de nombreux autres récepteurs de cytokines et de chimiokines. Le LPS et le TNF, les principaux stimulateurs de l'inflammation aberrante chez les MICI, interagissent avec leurs récepteurs respectifs (TLR4 et TNFR 1 et 2) et provoquent la production de cytokines pro-inflammatoires médiée par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans les CEIs. Dans le cas des MICI, un lien a été établi entre l'expression accrue de TLR4 et de TNFR chez les CEI et des réponses inflammatoires muqueuses induites par les CEIs exagérées, par conséquent, un dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale. En effet des travaux antérieurs ont révélé que le traitement par le Chitosane atténuait de façon marquée l'activation NF- $\kappa$ B stimulée par le LPS et le TNF ainsi que la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 dans les cellules T84 épithéliales du côlon humain. Comme il a récemment été démontré que le TNF dérivé de la CEI est suffisant pour causer une pathologie semblable à celle de Crohn chez la souris, il est donc suggéré que l'effet inhibiteur du Chitosane sur l'activation de la NF- $\kappa$ B et La production de cytokines

pro-inflammatoires dans les CEIs pourrait expliquer l'effet anti-inflammatoire du Chitosane observé dans les modèles de colite de souris.

De ce fait, des résultats antérieurs indiquaient que le Chitosane pourrait supprimer l'activation NF- $\kappa$  B dans la CEI dès le début de la réaction inflammatoire et ceux en empêchant la liaison des produits bactériens (c.-à-d. LPS) à leurs récepteurs membranaires (p. ex., TLR4), conduisant à l'atténuation de l'activation immunitaire muqueuse dans les modèles de souris de la colite. De plus, ils ont démontré que le traitement au Chitosane empêchait la diminution de la résistance électrique transépithéliale induite par le +LPS et le TNF ainsi que l'apoptose induite par le TNF dans les cellules T84. (Yousef, et al.).

Ces résultats suggèrent que l'administration orale de Chitosane pourrait préserver l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale par des mécanismes anti-oxydants, anti-apoptotiques et antibactériens, conférant ainsi une protection contre l'initiation et la progression de la colite in vivo.

Une autre étude menée a fait la preuve de l'efficacité du Chitosane en régénération tissulaire du colon. La dégradation du Chitosane chez les vertébrés est assurée par les lysozymes et les enzymes bactériennes retrouvés de façon prédominante au niveau du côlon (Jain, et al., 2007), (McConnell, et al., 2008). En effet ce mécanisme a été rapporté chez le rat (Zhang, et al., 2002) et on sait par ailleurs qu'il existe une grande similitude entre la flore colique humaine et celle du rongeur (Gulbake, et al., 2012).

Le Chitosane possède une myriade de propriétés biologiques telles que l'accélération de la cicatrisation des plaies, la stimulation de l'angiogenèse, production de collagène, sécrétion d'interleukine-8 par les fibroblastes et les effets antimicrobiens (Kazuo Azuma, et al., 2015),

Il a été démontré que le Chitosane a un effet inhibiteur sur l'E. Coli et les différentes bactéries pathogènes dans l'intestin à un DA élevé, un poids moléculaire faible (Zheng, et al., 2003), (Benbou, 2009) et a un potentiel zeta positif. Ce dernier est due à la densité élevée des groupes aminés  $-NH_3^+$  qui confère une charge positive au polymère. Cette charge forme des complexes polyélectrolytiques avec les peptidoglycanes négatifs de la paroi bactérienne et l'inhibe. (Sadeghi, et al., 2008), (Cruz-Romero, et al., 2013); (Krajewska, et al., 2011)

Par ailleurs des travaux antérieurs ont montré que différents poids moléculaires du Chitosane ont une gamme d'actions anti-inflammatoires, y compris l'inhibition de la production de TNF- $\alpha$ , IL-6, prostaglandine E2 (PGE2), cyclooxygénase-2 (COX-2), VCAM-1 et ICAM-1 en vitro. (Yu Qiao, et al.) . De plus une diminution des lésions des tissus oxydatifs, des lésions septiques, des lésions des organes et des niveaux de cytokines médiée par cette biomolécule a été observée. (Chou TC, 2003) (Citgez, et al., 2012); (Yu Qiao, et al.).

Les résultats obtenus sont en accord avec les données de la littérature et suggèrent que l'administration orale de Chitosane pourrait préserver l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale par des mécanismes anti-oxydants , anti-apoptotiques et antibactériens , conférant ainsi une protection contre l'initiation et la progression de la colite in vivo .De ce fait on conclut que le Chitosane possède une activité anti-inflammatoire très importante et peut donc servir comme un excellent traitement naturel pour de nombreuses maladies comme la rectocolite ulcéreuse hémorragique. Le Chitosane peut stimuler la réponse inflammatoire dans une courte période de temps de six jours à une dose de 1g pour la totalité du traitement.

Dans la deuxième partie de cette étude, des gélules contenant le Chitosane comme principe actif à une dose de 166mg sont fabriquées et ont subi un contrôle physico-chimique destiné aux capsules, dont le but est d'assurer la conformité de toutes les substances (principe actif et gélules) selon les normes de la pharmacopée européenne 9<sup>ème</sup> édition.

Les capsules ont subi un test d'identification du PA, test d'uniformité de poids, test de désintégration et un essai de dissolution.

Le produit fini (les gélules) a présenté des propriétés physico-chimiques de bonne qualité : uniformité de masse, un temps de désintégration inférieure à 10mn ce qui révèle la disparition immédiate de la gélule, et la dissolution retardée du PA (un temps de dissolution supérieur à 1 h), ce qui prouve la libération retardée du principe actif. Selon ses tests réalisés les gélules fabriquées sont conformes aux normes de la Pharmacopée Européenne 9<sup>ème</sup> édition.

---

# CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

## Conclusion et perspectives

La rectocolite ulcéro-hémorragique est une maladie qui affecte la qualité de vie des malades. Son étiologie n'est pas encore connue avec précision ; ce qui rend difficile d'établir un traitement de base, fixe et permanent. Bien que de nombreux agents thérapeutiques soient disponibles, ils ne sont pas dépourvus d'effets néfastes. C'est pour cela qu'une option thérapeutique alternative à base de nouvelles molécules d'origine biopolymères est nécessaire.

Notre choix a porté sur le Chitosane, un biopolymère d'origine marine qui fait partie de la classe des polysaccharides, et ceux en fonction de sa capacité à guérir les plaies et son profil antibactérien et antifongique.

Cependant, son activité anti-inflammatoire sur la physiopathologie de la rectocolite ulcéreuse n'a pas encore été confirmée à 100%.

L'étude comparative entre le Chitosane et la molécule de référence (la Dexaméthasone) a révélé qu'un traitement par le Chitosane à une dose de 1g a réduit l'étendue des lésions intestinales avec un score macroscopique de  $(3,41 \pm 1,45)$  comparativement à celui trouvé chez le groupe contrôle négatif  $8.45 \pm 1.33$ .

Pour la Dexaméthasone, les résultats obtenus étaient moyennement faibles  $(6.26 \pm 1.23)$

L'étude histologique a également confirmé l'efficacité du Chitosane qui était supérieure à celle de la Dexaméthasone.

En effet l'exploration clinique, biologique, des souris apporte des preuves rassurantes de l'innocuité du Chitosane dont la consommation prolongée à des doses réduites s'avère sans risque sur la santé des animaux, ce qui atteste encore de sa valeur pharmacologique (sans effets secondaires).

Cependant, cela reste une étude préliminaire qui nécessite des études complémentaires et approfondies. Ainsi de nombreuses perspectives peuvent être envisagées. Ces perspectives se résument par l'examen du mécanisme d'action de Chitosane en étudiant :

- Son effet sur le radical NO (Oxyde de Nitrique) qui est impliqué dans le processus inflammatoire
- Son rôle cicatrisant sur les cellules de Goblet
- Son effet sur la myéloperoxydase (enzyme halogéno-dépendante est active contre E. coli et L. acidophilus pour des pH acides) qui est un marqueur d'inflammation.

La deuxième partie de notre étude a consisté à fabriquer des gélules dont le Pa était le Chitosane à une dose de 166mg par gélule.

Les gélules fabriquées ont été soumises à des tests décrits pour les capsules par la pharmacopée européenne version 9 .Néanmoins nous n'avons pas effectué la totalité des essais. Ces derniers peuvent être ciblés comme perspectives et comprennent :

- Le dosage du principe actif dans les gélules par HPLC
- Le test de stabilité des gélules et du PA.
- Teste de propreté microbienne du PA.

## Références Bibliographiques

**Abuzaytoun R. et Shahidi F.** Chitin, chitosan, and co-products: Chemistry, production, applications and health effects. [Livre]. - [s.l.] : Advances in food and Nutrition Research 49, (2005), 93-135, 2005.

**Allez. M.** Utilisation pratique des anticorps monoclonaux anti-TNF au cours des maladies inflammatoires de l'intestin [Livre]. - [s.l.] : Clinique et Biologique Volume 32, n° 5P1 pages 467-477 , 2008.

**Alwash M. S., Ibrahim, N. and Ahmad, W. Y.** Identification and mode of action of antibacterial components from melastomalabathricumlin [Livre]. - [s.l.] : american journal of InfectiousDiseases, 2013.

**Aranaz I. Harris R., Heras A.** Chitosan amphiphilic derivatives. Chemistry and applications [Livre]. - [s.l.] : Current Organic Chemistry. 14: (2010), 308- 330, 2010.

**B.Acharya [et al.]** Nonspecific depolymerization of chitosane by pronase and characterization of the resultant products [Livre]. - [s.l.] : .Eur .J.Biochem.271.2004.713-723., 2004.

**B.Srividya [et al.]** Capsules and it's technology : an overview [Livre]. - India : Raghavendra institute ph pharmaceutical education and research, India – 515721, 2014.

**Backman C.H** Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? [Livre]. - [s.l.] : Physiological and Molecular plant pathology, 2000.

**Balamane [et al.]** Quelques données épidémiologiques de la maladie de Crohn à Alger [Livre]. - Alger, Algérie : , 25 -26/09/2013, Algérie, 26-27., 2013.

**Baldrick P** The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient [Livre]. - [s.l.] : Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2010 Apr;56(3):290-9. doi: 10.1016/j.yrtph.2009.09.015. Epub 2009 Sep 27., 2010.

**Bannwarth B.** Traitements anti-inflammatoires place des AINS classiques et des coxibs Anti-inflammatory therapy, Place of conventional NSAIDs and coxibs [Livre]. - [s.l.] : service de rhumatologie, groupe hospitalier Pelligrin (2005)524–531 , 2005.

**Baumgart D.C. Sandborn W.J** Inflammatory bowel disease: clinical aspects of established and evolving therapies [Livre]. - [s.l.] : the Lancet 369(9573), 1641-1657., 2007.

**Beaugerie [et al.]** Rectocolite hémorragique du diagnostic au traitement [Livre]. - [s.l.] : Hepato Gastro, Volume 21, numéro 3, Mars 2014, 2014.

**Benbbou Rajaa** DEVELOPPMENT ET CARACTERISATION DE FILMS ANTIMICROBIENS POUR LA BIOPRÉSERVATION DES PRODUITS MARINS PRÊTS À CONSOMMER [Livre]. - QUEBEC Canada :

departement des sciences des aliments et de nutrition faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, 2009.

**Bouguen [et al.]** Long-term outcome of perianal fistulizing Crohn's disease treated with infliximab [Livre]. - [s.l.] : Clin Gastroenterol Hepatol, 2013 Aug;11(8):975-81.e1-4, 2013.

**Bouhnik Y.** Manifestations extradiigestives des maladies inflammatoires [Livre]. - [s.l.] : la revue de medecine interne, 27, 51-53., 2006.

**Bounihi** Criblage phytochimique, Étude Toxicologique et Valorisation Pharmacologique de Melissa officinalis et de Mentha rotundifolia (Lamiacées). Thèse de Doctorat de Sciences du Médicament [Livre]. - [s.l.] : Université Mohammed V, Faculté de médecine et de pharmacie, Rabat, 199p., 2016.

**Briant J.** Phénomènes d'interface agents de surface : Principes et modes d'action [Livre]. - [s.l.] : École national supérieur du pétrole et des moteurs, Editions TECHNIP, 1989 - 340 pages, 1989.

**C. [et al.]** influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films [Livre]. - [s.l.] : Biomaterials, 22 (2001) 261-268., 2001.

**C.Aimin [et al.]** antibiotic loaded chitosan bar. An in vitro, in vivo study of a possible treatment for osteomyelitis [Livre]. - [s.l.] : clin.Orthop. relat Res .(1999) 239-247., 1999.

**C.Chatelet ., O.Damour, and A.domard** Influence of the degree of acetylation on some Biological propreties of Chitosane Films. [Livre]. - 2001.

**C.J.Brine et Austin** Chitin Variability with species and method of preparation B,Comparative Biochemistry and physiology [Livre]. - [s.l.] : 69B,P.R.1981.283-286., 1981.

**C.Oi Liu,F.** Current Medicinal Chemistry [Livre]. - 2000.

**Capsules Fridrun Podczeck and Brian E. Jones** Drug develepeement and industrial pharmacy [Livre]. - [s.l.] : Vol. 28, No. 9, pp. 1163–1169, 2002, 2002.

**Carillon A,** Place de la Phytotherapie dans les Systemes de Santé au XXI's [Livre]. - [s.l.] : In Conference SIPAM-Djerba, 1-7., 2009.

**Cetinkaya [et al.]** Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. [Livre]. - [s.l.] : Tohoku J Exp Med. Tohoku J Exp Med. 206 : 131-139, 2005.

**Chang [et al.]** pH effects on solubility, zeta potential, and correction between antibacterial activity and molecular weight of chitosane [Livre]. - [s.l.] : Departement of food science, National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan, R.O.C, 2015.

**Chaparro M. et Gisbert P.,J.** New molecules in the treatment of inflammatory bowel disease. [Livre]. - [s.l.] : Gastroenterol Hepatol, 39 (6), 411-423. doi: 10.1016 / j.gastrohep.2015.09.017 , 2016.

**Chen : X. G., [et al.]** Molecular affinity and permeability of different molecular weight chitosan membranes [Livre]. - [s.l.] : Agric Food Chem 50(21):5915-5918., 2002.

**Chen C. S., Liaw, W. Y. and Tsai, G. J.,** Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation [Livre]. - [s.l.] : Journal of Food Protection .

**Cheung Hoi-Yan [et al.]** A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development [Livre]. - New Orleans, LA 70148 : Departement of Mechanical Engineering, University of New Orleans, USA, 2 Februry 2006.

**Chou TC FU E, Shen EC** Chitosan inhibits prostaglandin E2 formation and cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-treated RAW [Livre]. - [s.l.] : Volume 308, Issue 2, 22 August 2003, Pages 403-407, 2003.

**Citgez Bulent [et al.]** Effects of chitosan on healing and strength of clonic anastomosis in rats [Livre]. - [s.l.] : Acta Cir. Bras. vol.27 no.10 São Paulo Oct. 2012, 2012.

**Colombel [et al.]** Influximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease [Livre]. - [s.l.] : New England Journal of Medicine, 362(15),1383-1395 , 2010.

**Cooper [et al.]** Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis [Livre]. - [s.l.] : Lab Invest. 1993 Aug;69(2):238-49., 1993.

**Cortot A., [et al.]** inflammatory bowel disease : genetir or environmental diseases ? [Livre]. - [s.l.] : Gastroenterologie clinique et biologique, 33(8-9), 681-691., 2008.

**Cruz-Romero [et al.]** Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. [Livre]. - [s.l.] : Food control 34(2), 393-397., 2013.

**D.vllasliu [et al.]** Tight Junction Modulation by chitosane nanoparticules , compariason with chitosane Solution [Livre]. - [s.l.] : Int.J.Pharma 2010 Nov 15;400(1-2):183-93, 2010.

**Delphine RUTOT Philippe DUBOIS** Les (bio)polymères biodégradables: l'enjeu de demain ? [Section du livre] // Chimie des matières renouvelables. - Université de Mons-Hainaut : service des Matereiaux Polymères et composites,Centre de Recherche Materia Nova, juin 2004.

**Delphine RUTOT Philippe DUBOIS** les polymères issus du végétal : matériaux à propriétés spécifiques pour des applications ciblées en industrie plastique [Section du livre]. - Place du Parc : Service des matériaux polymères et composites, centre de recherche Materia Nova, Université de Mons-Hainaut.

**DeMichele [et al.]** Sulfasalazine crystalluriainduced anuric renal failure [Livre]. - [s.l.] : clinical gastroenterology and hepatology, 10(2), 32, 2012.

**Deshmukh C.D. Veeresh B., Pawar A.T.** Protective effect of Emblica officinalis fruits extract on acetic acid induced colitis in rats [Livre]. - [s.l.] : J. Herb. Med. Toxicol. 4,83-87, 2010.

**Dr. Dayaram Patel, Surat et Gujarat** An antervative to gelatin capsule shell [Livre]. - [s.l.] : International journal of applied pharmaceutical and biological research 2016,1(1):74-82 , 2016.

**DW.Jekins S.M Hudson** chitin and Chitosan [Livre]. - [s.l.] : EPST .Mark HF ; ed .New york , 2003.

**E. Louis [et al.]** Génétique et environnement dans les maladies inflammatoires chroniques et l'intestin [Livre]. - [s.l.] : Renue Médicale de Liège 2012; 67 : 5-6 : 298-304, 2012.

**E. Louis J. Belaiche, C. Reenaers** Nouveautés dans la stratégie thérapeutique des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [Livre]. - Belgique : service de gastroentérologie, CHU de Liège Post'U (2010) 181-188, 2010.

**E.I Rabea [et al.]** chitosan as antimicrobial agent : application and mode of action [Livre]. - [s.l.] : biomacromolecules , 4 (2003) 1457-1465, 2003.

**E.J. Jung D.K .Youn , S, H . Lee , H.K.No, J .G.Ha , and W .Prinyawiwatkul** Antibacterial activity of chitosans with different degrees of Deacetylation and viscosities [Livre]. - [s.l.] : international journal of Food Science and Technology , 2010.

**Ekbom A. et Montgomery, S.M** Environmental risk factors (excluding tobacco and microorganisms): critical analysis of old and new hypotheses [Livre]. - [s.l.] : Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 18(3), 497-508, 2004.

**Elias A.** Etude du processus de coagulation-floculation du système montmorillonitechitosane dans l'élimination de métaux de transition [Livre]. - MOREAL, Canada : Université du QUEBEC, 2006 p. 8-13, 2006.

**Elodie Quévrain et Philippe Seksik** Microbiote intestinal : de la diarrhée post-antibiotiques aux maladies inflammatoires intestinales [Livre]. - [s.l.] : la presse médicale volume 42,n°1 pages 45-51 , 2012.

**Elson [et al.]** Experimental models of inflammatory bowel disease. [Livre]. - [s.l.] : Gastroenterology, 109 : 1344-1367, 1995.

**Ferguson L. R.,** Chronic inflammation and mutagenesis [Livre]. - [s.l.] : Mutation Peasarch/Fubdamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 690(1), 3-11., 2010.

**Fiocchi C.** Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. [Livre]. - [s.l.] : Gastroenterology, 115(1), 182-205., 1998.

**Frank [et al.]** Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases [Livre]. - [s.l.] : intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. Inflammatory Bowel Diseases, 17(1), 179-184., 2011.

**Funkhouser J. D. et N. N. Aronson Jr.** Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family [Livre]. - [s.l.] : BMC Evol Biol 7: 96., 2007.

**G. A. F. Roberts K. E. Taylor** The formation of gels by reaction of chitosan with glutaraldehyde [Livre]. - [s.l.] : Makromolekulare Chemie, 1989.

**G. Bouma et Strober W.** The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease [Livre]. - [s.l.] : Nat Rev Immunol, 2003 Jul;3(7):521-33., 2003.

**Garg Deepak [et al.]** three soft gelatin capsules: development, applications, and recent patent [Livre]. - India : international research journal of invention in pharmaceutical sciences (Pharmacy), Sri Ganganagar-335001 (Raj.) INDIA 2014, 2014.

**Gerard J.Derrickson, B.** Manuel anatomie et de Physiologie humaine [Livre]. - Canada : Adaptation française de sofie Dubé et Louise Martin Vol824 :567-569 p, 2017.

**Gulbake [et al.]** Chitosan: a potential polymer for colon-specific drug delivery system. [Livre]. - [s.l.] : Expert opinion on drug delivery, 9(6), 713-729., 2012.

**H. P. Brack S. A. Tirmizi, W. M. Risen,** A spectroscopic and viscosimetric study of the metal ion-induced gelation of the biopolymer chitosan [Livre]. - [s.l.] : Polymer, 1997.

**H.K.Meyers S.P.,& Lee** Isolation and characterisation of chitin from crawfish shell waste [Livre]. - [s.l.] : Journal of Agricultural and food Chemistry, 37, K.S.1989.575-579., 1989.

**H.Kastas A.Mohamed and N.M Zin** physicochemical effect of Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles on Antibacterial Activity against Gram-Positive and Gram-negative Bacteria. [Livre]. - [s.l.] : J.Med.Sci, 11(4) :192-197 2011, 2011.

**Hanauer [et al.]** The state of the art in the management of inflammatory bowel disease [Livre]. - [s.l.] : Reviews in gastroenterological disorders;3(2):81-92., 2002.

**Hartley [et al.]** Antigen from colon of germfree rats and antibodies in human ulcerative colitis [Livre]. - [s.l.] : Annals of the New York Academy of Sciences, 124, 377-394, 1965.

**Hoi-Yan [et al.]** A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development [Livre]. - New Orleans : Departement of Mechanical Engineering, University of New Orleans, USA, Volume 38, Issue 3, April 2007, Pages 291-300, 2007.

**Holy Nadia Rabetafika Michel Paquot , Philippe Dubois** Les polymères issus du végétal : matériaux à propriétés spécifiques pour des applications ciblées en industrie plastique [Livre]. - Place du Parc, 20B-700 Mons (Belgique) : Université de Mons-Hainaut, 28 mars 2006.

**Hosseini S.F., Rezaei, M., Zandi, M. & Ghavi, F.F.** Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films [Livre]. - [s.l.] : Food Chemistry, 2013.

**ISCAY-AUSSEL Audrey** Validation pré-clinique d'un produit d'ingénierie vasculaire à base d'hydrogel de chitosane [Livre]. - [s.l.] : école doctorale des sciences de la vie et de la santé, Université de Bordeaux, Décembre 2017.

**Izume [et al.]** Action pattern of Bacillus sp. no. 7-M chitosanase on partially N-acetylated chitosan. Biosci Biotechnol [Livre]. - [s.l.] : Biosci Biotechnol Biochem.1992;56:448-453., 1992.

**J.Blackwell** chitin in :Biopolymers.AG.walton [Livre]. - [s.l.] : New York : Academic press.173.474..

**J.Brugnerotto J.Lizardi, F.M. goycoolea, W.ArgU elles-Monal,j.Desbrieres ,& Rianudo,M** An infrared investigation in relation with Chitin and chitosan characterization Polymers [Livre].

**Jain [et al.]** Design and development of hydrogel beads for targeted drug delivery to the colon. [Livre]. - [s.l.] : Aaps Pharmscitech, 8(3), E34-E41., 2007.

**Jain SK et al.** [Livre]. - [s.l.] : AAPS PharmSciTech 2007;8:E56., 2007.

**Jess [et al.]** Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies [Livre]. - [s.l.] : Gastroenterology and hepatology, 10(6), 639-645., 2012.

**Jony Mallik [et al.]** Hard gelatin capsules (two pieces)- a unique pharmaceutical dosage form- an exhaustive review [Livre]. - [s.l.] : Asian Journal of pharmaceutical research and development Vol.1 (4) July– August 2013:1-9, 2013.

**Jurjus [et al.]** Animal models of inflammatory bowel disease. [Livre]. - [s.l.] : Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 50 : 81-92, 2004.

**K. [et al.]** Macroscopy and microscopy of chronic idiopathic inflammatory bowel diseases (IBD) Acta Endoscopica [Livre]. - [s.l.] : Service d'Anatomie Pathologique, HOpital Civil, CHR Tournai (Belgique) Macroscopy and microscopy of chronic idiopathic inflammatory bowel diseases (IBD) Acta Endoscopica Volume 29 - N ~ 3 - 1999, 1999.

**K. SOUAGA K [et al.]** Plaidoyer pour une utilisation raisonnée des anti-inflammatoires en odontostomatologie [Livre]. - [s.l.] : service de pathologie et chirurgie Odonto-stomatologiques et Maxillo-faciales UFR d'Odonto- Stomatologie - 22 BP 1231 Abidjan (Côte d'Ivoire).

**kaci Ghalia** Caractérisation des propriétés anti-inflammatoires de souches [Livre]. - [s.l.] : Laboratoire de l'INRA, UMR1319 Micalis, Le 22 Juin 2012 P103-104, 2012 .

**kauss [et al.]** Effects of Membrane- permeability suspension -cultured Glycine- Max and Phaseolus-Vulgaris cells [Livre]. - [s.l.] : plants physiology , 70 (1982) 1449-1459, 1982.

**kauss D.H.Young and H .** release of calcium from suspension -cultured Glycine- Max cells by chitosan , Other polycations , and polycamines in relations to effects on Membrane- permeability , plant physiology [Livre]. - [s.l.] : American Society of Plant Biologists November 1983,10.1104/pp.73.3.698, 1983.

**Kazuo Azuma [et al.]** Chitin, Chitosan and Its Derivatives for Wound Healing: Old and New Materials [Livre]. - [s.l.] : Retraction: Azuma, K. et al. Chitin, ChDerivatives for Wound Healing: Old and New Materials. J. Funct. Biomater. 2015, 6, 104-142., 2015.

**KHAN [et al.]** Reporting degree of deacetylation values of chitosan : the influence of analytical methods [Livre]. - [s.l.] : J. Pharm. Sci., 5,205 212, 2002.

**Khan K. J., [et al.]** Efficacy of immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis [Livre]. - [s.l.] : The american Journal of Gastroenterology, 106(4), 630-642., 2011.

**Khan T.khan, .A., Peh,K** Mechanical bioadhesive strength and biological evaluation of chitosan films for wound dressing [Livre]. - [s.l.] : Journal of Pharmaceutical and Pharmaceutical Science, 3(3),H.S.2000.3003-3371., 2000.

**Khor [et al.]** Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease [Livre]. - [s.l.] : Nature, 474(7351), 307-317., 2011.

**Kirsner J. B.** Historical aspects of inflammatory bowel disease. [Livre]. - [s.l.] : Journal of Clinical Gastroenterology, 10(3), 286-297, 1988.

**Klotz C., Barret, M., Dhooge, M., Oudjit, A., Chaussade, S., Coriat, R., & Abitbol, V.** Rectocolite hémorragique: conduite diagnostique et prise en charge thérapeutique. [Livre]. - [s.l.] : La Presse Médicale, 44(2), 144-149, 2015.

**Klotz Caroline [et al.]** Rectocolite hémorragique : conduite diagnostique et prise en charge thérapeutique [Livre]. - [s.l.] : La Presse Médicale, Volume 44, Issue 2, February 2015, Pages 144-149, 2015.

**Krajewska [et al.]** Probing the Modes of Antibacterial Activity of Chitosan. Effects of pH and Molecular Weight on Chitosan Interactions with Membrane Lipids in Langmuir Films. [Livre]. - [s.l.] : Biomacromolecules, 12(11), 4144-4152. , 2011.

**Kumirska Jolanta [et al.]** Application of Spectroscopic Method for structural analyses of chitin and Chitosane [Livre]. - [s.l.] : Mar. Drugs 2010, 8, 1567-1636; doi:10.3390/md8051567, 2010.

**Kyoung [et al.]** Physical characteristics of decolorized chitosan as affected by sun drying during chitosan preparation. [Livre]. - [s.l.] : Carbohydrate Polymers 69.2007.707-712., 2007.

**Lamprecht [et al.]** Size dependent targeting of micro and nano-particulate carriers to the inflamed colonic mucosa [Revue] // Pharm Res 18: 788-793, 2001. - 2001.

**Landman C. Ouévrain E.** Le microbiote et implication physiopathologique [Livre]. - [s.l.] : Rev Med Interne, Volume 37, Issue 6, June 2016, Pages 418-423, 2015.

**Larry L.Augsburger and Stephen W.Hoag** Pharmaceutical dosage forms capsules [Livre]. - [s.l.] : Reference - 421 Pages - 25 Color & 198 B/W Illustrations , 2017.

**Lee [et al.]** Dexamethasone-loaded Polymeric Nanoconstructs for Monitoring and Treating Inflammatory Bowel Disease. [Livre]. - [s.l.] : Theranostics, 7:3653-3666, 2017.

**Liu N. [et al.]** Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of Escherichia coli. [Livre]. - [s.l.] : Carbohydrate polymers, 64(1), 60-65., 2006.

**Louis [et al.]** Génétique et environnement dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [Livre]. - [s.l.] : Renué Médicale de Liège 2012; 67 : 5-6 : 298-304, 2012.

**M. N. Khalid [et al.]** M. N. Khalid, L. Ho, F. Agnely, J. L. Grossiord, G. Couarraze, Swelling properties and mechanical characterization of a semi-interpenetrating chitosan/polyethylene oxide network, comparaison with a chitosan reference gel [Livre]. - [s.l.] : S. T. P. Pharma Sciences.

**M.N.Moorjani V.Achutha ,& Khasim** Parameters affecting the viscosity of chitosan from prawn waste ..Journal of Food science and Thecnology [Livre]. - [s.l.] : Journal of Food science and Thecnology, 12, D.I..1975.187-189., 1975.

**M.Rinaudo** Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in polymer science [Livre]. - 2006.

**Maloy K.J, et Powrie, F.** Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease [Livre]. - [s.l.] : Nature, 474(7351), 298-306., 2011.

**MARIO Fatima** Systèmes multiparticules par voie orale dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [Revue]. - 2012.

**Marteau [et al.]** recommandations pour la pratique clinique dans le traitement de la rectocolite ulcéro-hémorragique [Livre]. - [s.l.] : Gastroenterologie clinique et biologique, 2004;28:955-960 955 , 2004.

**MC Rousselet [et al.]** Inflammation et pathologie inflammatoire [Livre]. - [s.l.] : Chatelet Mai 2005, 2005.

**McConnell [et al.]** An investigation into the digestion of chitosan (noncrosslinked and crosslinked) by human colonic bacteria. [Livre]. - [s.l.] : Journal of pharmaceutical sciences, 97(9), 3820-3829., 2008.

**Molodecky [et al.]** Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review [Livre]. - [s.l.] : Gastroenterology, 142(1), 46-54, 2012.

**Moreau J.** Traitement de la rectocolite hémorragique [Livre]. - [s.l.] : la lettre de l'hépatogastroentérologue, 15 :197-199., 2012.

**Muxika A., A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero and K. de la Caba** Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. [Livre]. - [s.l.] : International Journal of Biological Macromolecules, 2017.

**Nancey [et al.]** Apport des modèles animaux d'inflammation intestinale des les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [Livre]. - [s.l.] : Hépatogastro,15:34-35. , 2008.

**Nath [et al.]** Design, development and optimization of oral colon targeted drug delivery system of azathioprine using biodegradable polymers. [Livre]. - [s.l.] : Pharmaceutical development and technology, 18(5), 1131-1139., 2013.

**No HK Meyers SP, Prinyawiwatkul W, et al.** Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods [Livre]. - [s.l.] : J Food Sci, 2007.

**Oliver Allo Pascal blanc, Marie-ange Dalmasso** Pharmacie Galénique [Livre]. - Juin 2008.

**Omwancha [et al.]** Chitosan as a pore former in coated beads for colon specific drug delivery of 5-ASA. [Livre]. - [s.l.] : International journal of pharmaceutics, 441(1-2), 343-351., 2013.

**Otari Gaikwad, Shete, Upasani** Protective effect of aqueous extract of Spinacia oleracea leaves in experimental paradigms of inflammatory bowel disease. [Livre]. - [s.l.] : Inflammopharmacology.52:876-881., 2012.

**Oumaira Rahmouni Laurent Dubuquoy** Pierre Desreumaux, Christel Neut Microbiote intestinal et développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [Livre]. - [s.l.] : médecine/sciences, ; 32 : 968-73, 2016.

**P.Bourlioux** Microbiote intestinal, santé et environnement [Livre]. - [s.l.] : Actualité du microbiote intestinal Réflexions et propositions du Groupe de travail de l'Académie nationale de pharmacie, 2013.

- Park [et al.]** Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. [Livre]. - [s.l.] : Carbohydrate Polymers, 55(1), 17-22, 2004.
- Parke A. et Parke D. V.,** The pathogenesis of inflammatory disease: Surgical shock and multiple system organfailure. [Livre]. - [s.l.] : Inflammopharmacology, Volume 3, Issue 2, pp 149–168, 1995.
- Parkes [et al.]** Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility [Livre]. - [s.l.] : Nature Genetics, 39(7), 830-832, 2007.
- Paster et al** [Section du livre]. - 2003.
- Philippe MARTEAU [et al.]** recommandations pour la pratique clinique dans le traitement de la rectocolite ulcéro-hémorragique [Livre]. - [s.l.] : Gastroenterol Clin Biol 2004;28:955-960 955 , 2004.
- Pizarro T.T. et Cominelli F. ).** Cytokine therapy for Crohn's disease: advances in translational research [Livre]. - [s.l.] : Annual Review of Medicine, 58, 433-444, 2007.
- Prasad Deva** formulation and modifying drug release from Hard and Soft [Livre]. - India : council of scientific and industrial research, indian institute of integrative medicine delivery June - July 2017; 6(4):2663-2677, July 2017.
- Qi [et al.]** Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles Carbohydrate [Livre]. - [s.l.] : Carbohydrate Research, Volume 339, Issue 16, 15 November 2004, Pages 2693-2700, 2004.
- R.A.A Muzarelli B.Muwarelli** Structural and functional Versatility of chitins [Livre]. - [s.l.] : S.Dumitriu (ed) Structural Diversity and Functional Versatility of Polysaccharides Marcel Dekker New York, 1998.
- Rabea El Badawy ME-T, Stevens CV, Smaghe G, Steurbaut W** Chitosan as antimicrobial agent : applications and mode of action. Biomacromolecules [Livre]. - 2003.
- Rabetafika Holy Nadia, Paquot Michel et Dubois Philippe** Les polymères issus du végétal : matériaux à propriétés spécifiques pour des applications ciblées en industrie plastique [Livre]. - Place du Parc, 20B-700 Mons (Belgique) : [s.n.], 28 mars 2006.
- Rami L., [et al.]** Physicochemical modulation of chitosan-based hydrogels induces different biological responses: interest for tissue engineering [Livre]. - [s.l.] : J Biomed Mater Res A 102(10): 3666-3676., 2014.
- Raphael Oussou et al Coffi Kanko, Natalie Guessend, Séri Yolou, Gérard Koukoua Mireille Dosso** Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de cote-d'ivoire [Livre]. - 2004.
- Renata Adami Alessia Di Capua, Ernesto Reverchon, Via Giovanni Paolo, Fisciano** Supercritical assisted atomization for the production of curumin-biopolimer microspheres [Livre]. - [s.l.] : Powder Technology, 2017.
- Rinaudo M.** Chitin and chitosan: Properties and application [Livre]. - [s.l.] : Progress in Polymer Science, 31, 603–632., 2006.

- Rivero [et al.]** Composition and bilayer films based on gelatin and chitosan. [Livre]. - [s.l.] : food engineering, 90, 531–539., 2009.
- Rodriguez-Vázquez M. [et al.]** Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue [Livre]. - [s.l.] : Engineering in Regenerative Medicine." BioMed Research International 2015: 1, 2015.
- Roller S Covill N.** The antifungal properties of chitosan [Livre]. - [s.l.] : laboratory media and apple juice. Int J Food Microbiol, 1999.
- Rosenthal [et al.]** Analysis of absorption enhancers in epithelial cell models. [Livre]. - [s.l.] : Annals of the New York Academy of Sciences, 1258(1), 86-92., 2012.
- Roumestan [et al.]** Les Glucocorticoïdes et leur récepteur Mécanismes d'action et conséquences clinique [Livre]. - [s.l.] : la revue de médecine interne, 25 :636-647., 2004.
- RUTOT Delphine et DUBOIS Philippe** Chimie des matières renouvelables: Les (bio)polymères biodégradables :l'enjeu de demain ? [Livre]. - [s.l.] : Université de Mons-Hainaut, Place du Parc, 20, 7000 Mons, 2004. - Chimie nouvelle - N° 86 : pp. 66-74.
- Sadeghi [et al.]** Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods [Livre]. - [s.l.] : International Journal of Pharmaceutics, 355(1-2), 299-306., 2008.
- Sagheer Al [et al.]** characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf Carbohydrate [Livre]. - [s.l.] : Polymers, 2009, 77, 410–419, 2009.
- Sanford G.Jak Winterowd and A.Paul** Chitin and Chitosane, polysaccharides and their application [Livre]. - [s.l.] : Edition Marcel Dekker NewYork , 1995.
- Scalbert A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L.** Dietary polyphenols and prevention of diseases [Livre]. - [s.l.] : Critical Reviews in food science and nutrition, 2005.
- Schäcke H. Döcke W.D., Asadullah K.** Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids [Livre]. - [s.l.] : Pharmacol Ther, 2002.
- Schulzke J. D., [et al.]** Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis [Livre]. - [s.l.] : Annals of the New York Academy of sciences, 1072(1), 288-299., 2006.
- Seng J.M.** Chitine, Chitosane et dérivés; de nouvelles perspectives pour l'industrie. Biofuture [Livre]. - [s.l.] : Biofutur, 9, 40-44., 1988.
- Sharma S.B.Rao and C.P** use of chitosan as a biomaterial : studies on its safety and hemostatic potential [Livre]. - [s.l.] : J Biomed. Mater Res, 1997.
- Skjak-braek G Anthonsen T, Sandford** Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications [Livre]. - [s.l.] : Elsevier London and New York(1989) , 1989.

**Sokker [et al.]** Synthesis and characterization of hydrogels based on grafted chitosan for the controlled drug release carbohydrate polymers [Livre]. - [s.l.] : Carbohydrate Polymers, 2009, 75, 222–229, 2009.

**Somani Badgujar, Sutariya, Saraf** Beneficial Effects of THSG on Acetic Acid-Induced Experimental Colitis: Involvement of Upregulation of PPAR- $\gamma$  and Inhibition of the Nf-Kb Inflammatory Pathway [Livre]. - [s.l.] : Indian Journal of Experimental Biology. 52:876-881, 2014.

**SOTNIKOVA Ruzena, NOSALOVA Viera et Jana NOVAROVA** Efficacy of quercetin derivatives in prevention of ulcerative colitis in rats [Livre]. - [s.l.] : Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, 2013 , 1337-9569 ,Vol. 6(1): 9–12. , 2013.

**Spencer J. P., El Mohsen, M. M. A., Minihane, A. M., & Mathers, J. C.** Biomarkers of the intake of dietary polyphenols : strenghts, limitations and application in nutrition research [Livre]. - [s.l.] : British journal of nutrition, 2008.

**Sprague R. G.** Cortisone and ACTH, a review of certain physiologic effects and their clinical implications [Livre]. - 1951.

**Stevens A. Lowe B., J. & Young** Anatomie pathologique [Livre]. - [s.l.] : 4<sup>ème</sup> édition, de Boeck Supérieur 10-11., 2004.

Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. Carbohydr. Polym [Livre]. - [s.l.] : Carbohydr. Polym. 54, 527-530.2003

**Sudarshan NR Hoover DG, Knorr D** Antibacterial action of chitosan. food Biotechnol [Livre].

**suyatama Nugraha Edhi** Developpement de films biodegradable a base de chitosane étude de mélange chitosane/PLA de plastificateur et de la comptabilisation [Livre]. - [s.l.] : Université de reims, Juin 2006.

**Tadros Th.F.,** Solid/Liquid Dispersions [Livre]. - [s.l.] : Academic Press Inc, 1987., 1987.

**Tanabe T. Tohnai N.** Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression [Livre]. - 2002.

**Tardif Kim** Le 17 $\beta$ -Estradiol combiné à un biopolymère à base de chitosan accroît la biocompatibilité des cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse. [Livre]. - [s.l.] : Université de Montréal, 2009-07 (octroi du grade: 2009-12-03), 2009.

**Thomas courant** Nanoparticules incorporant des complexes inorganiques à visée diagnostique [Revue] // Université de Reims Champagne-Ardenne. - [s.l.] : Université de Reims Champagne-Ardenne, 2011. - p. 43.

**Topcu-Tarlacalisir [et al.]** Effects of curcumin on Apoptosis and Oxidoinflammatory Regulation in a Rat Model of Acetic Acid-Induced Colitis [Livre]. - [s.l.] : Journal of Medicinal Food, 16 (4) : 296-305, 2013.

**Touboul J.,** Diarrhée de l'épisode aigu infectieux au trouble fonctionnel chronique. Actualité thérapeutique [Livre]. - [s.l.] : Actualité thérapeutique, 10 :164-167., 2007.

**Tozaki H. [et al.]** Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: enhanced localization of 5-aminosalicylic acid in the large intestine accelerates healing of TNBS-induced colitis in rats. [Livre]. - [s.l.] : Control Release 2002;82:51-61, 2002.

**Turk Rhen John A. Cidlowski,** Anti-inflammatory Action of Glucocorticoids - New Mechanisms for old drugs [Livre]. - [s.l.] : N Engl J Med 2005; 353:1711-1723, 2005.

**Umadevi [et al.]** Formulation and evaluation of chitosan microspheres of aceclofenac for colon-targeted drug delivery. [Livre]. - [s.l.] : Biopharmaceutics & drug disposition, 31(7), 407-427., 2010.

**Umadevi [et al.]** Formulation and evaluation of chitosan microspheres of aceclofenac for colon-targeted drug delivery. [Livre]. - [s.l.] : Biopharmaceutics & drug disposition, 31(7), 407-427., 2010.

**Vaishnav S., [et al.]** ). Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface [Livre]. - [s.l.] : Proceedings of the national Academy of Sciences, 105(52), 20858-20863, 2008.

**Vásconez M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J., & Gerschenson, L. N** Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings [Livre]. - [s.l.] : food reaserch international, 2009.

**Vidal A., [et al.]** Life events and inflammatory bowel disease relapse: a prospective study of patients enrolled in remission. The American Journal of Gastroenterology [Livre]. - [s.l.] : The American Journal of Gastroenterology, 101(4), 775-781, 2006.

**Vijavalekshmi V.** Uv-Visible, mechanical and anti-microbial studies of chitosan- Montmorillonite Clay/TiO<sub>2</sub> Nanocomposites [Livre]. - India : Departement of Chimesty S.N. college Vol. 4(ISC-2014), 131-135, 2015.

**VinodPrabhu V., Guruvayoorappan C.** Protective effect of marine mangrove Rhizophoraapiculata on acetic acid induced experimental colitis by regulating anti-oxidant enzymes, inflammatory mediators and nuclear factor-Kappa B subunits [Livre]. - [s.l.] : International Immunopharmacology,18 : 124-134., 2013.

**Welcker [et al.]** Augmenntation de la perméabilité intestinale chez les patients atteints d'une maladie inflammatoire de l'intestin [Livre]. - [s.l.] : European Journal of Medical Research, 9, 456-460 , 2004.

**Xianomin Wang Lio Zhao, Tianzhao Han, Shaofei Chen, Jialing Wang** Protective effects of 2,3,5,4' tetrahydroxystilbene -2-O-beta-D-glucoside, an active component of polygonum multiflorum Thumb, on experimental colitis in mice [Livre]. - [s.l.] : European Journal of Pharmacology, 2008.

**Xuan [et al.]** A new linear potentiometric titration methode for the determination of deacetylation degree of chitosane [Livre]. - [s.l.] : Carbohydrate polymers 54.2003.457-463., 2003.

**Youbaré-Ziébrou [et al.]** Activités anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de *Saba senegalensis* Pichon [Livre]. - [s.l.] : Phytothérapie,14:213-219, 2015.

**Youbaré-Ziébrou M N. [et al.]** Activités anti-inflammatoire analgésique et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de *Saba senegalensis* Pichon [Livre]. - [s.l.] : Phytothérapie,14:213-219, 2015.

**younes et al J.appl, Biosci** Activité antimicrobienne des algues marines [Livre]. - 2009.

**Young Na [et al.]** Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights [Livre]. - [s.l.] : International Journal of Food Microbiology, Volume 74, Issues 1–2, 25 March 2002, Pages 65-72, 2002.

**Yousef Mohammad [et al.]** Chitosan oligosaccharide as potential therapy of inflammatory bowel disease : Therapeutic efficacy and possible mechanisms of action [Livre]. - Taïland : Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand b Research Center of Transport Protein for Medical Innovation, Faculty of Science, Mahidol University, Pharmacol Res. 2012 Jul;66(1):66-79..

**Yu Qiao [et al.]** Synergistic Activation of inflammatory Cytokine Gene by interferon-g-induced Chromatin Remodeling and Toll-like receptor signaling [Livre]. - [s.l.] : USA 5Graduate Program in Immunology and Microbial Pathogenesis, Weill Cornell Graduate School of Medical Sciences, New York, NY 10065, USA.

**Zhang [et al.]** In vitro degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents. [Livre]. - [s.l.] : Biomaterials 2002;23:2761-2766., 2002.

**Ziltener [et al.]** Non steroidal Anti-Inflammatory Drugs for Athletes [Livre]. - [s.l.] : Update annals of Physical and Rehabilitation Medicine, 53:278–288., 2010.

## Annexes



**Annexe II-1** l'automate de circulation.



**Annexe II-2** : station d'enrobage.



**Annexe II-3** : microtome et plaque chauffante.



**Annexe II-4** l'équipement de coloration Dako Cover Stainer

## Résumé

La rectocolite est une maladie inflammatoire de l'intestin répandue avec une étiologie hétérogène (génétique et immunologique). Elle est traitée par des médicaments comme la Dexaméthasone® qui, à long terme peut causer des effets secondaires. Pour cela, la valorisation des ressources naturelles pour combattre ce type de maladie est la préoccupation des chercheurs. Le but de notre étude était d'évaluer l'effet anti-rectocolite (anti-inflammatoire) du Chitosane induite chez les souris albinos par l'acide acétique (5%). Les souris ont été séparées en six lots : le Témoin (non traité et non ulcéré), le groupe contrôle négatif (ulcéré et non traité), le contrôle positif ulcéré et traité avec la Dexaméthasone® (100mg/kg), et les groupes test ulcéré et traité par le Chitosane a des différentes dose (0.5 ; 0.75 et 1 g/ kg) pour la totalité du traitement estimé de six jours. L'efficacité du Chitosane a été évaluée par des scores macroscopique et microscopiques. Les scores clinique ont montré que le Chitosane a une dose de 1g/kg pour la totalité du traitement a réduit de façon très significative les dommages causés par l'acide acétique avec un score de (3,41 ± 1,45) par rapport à ceux du contrôle positif qui a réduit de façon moindre l'inflammation (6.26 ± 1.23). L'étude histologique des colons a pu valider l'effet du Chitosane par la diminution de l'infiltration des neutrophiles et les ulcérations dans le côlon ainsi que par la récupération structurale de la muqueuse. Ces résultats fournissent une preuve que le Chitosane a un effet protecteur dans la RCUH qui pourrait être dû à ses activités antioxydante, anti infectieuse, anti-inflammatoire et cicatrisante.

Le Chitosane a été conditionné sous forme de capsules de gélatine, chaque capsule contient 166mg. Les gélules sont soumises aux certains tests décrits par la pharmacopée européenne et destiné aux formes pharmaceutiques solides oraux.

Selon ses tests réalisés les gélules fabriquées sont conformes aux normes de la Pharmacopée Européenne 9ème édition.

**Mots clés :** Chitosane, caractérisation, rectocolite, histologie, gélules, MICI.

## المخلص

بعد داء القولون التقرحي مرض التهابي في الامعاء ينجم عن أسباب مختلفة (وراثية و مناعية) يتم علاجها بأدوية مثل Dexamethasone® والتي على المدى الطويل يمكن ان تسبب أعراضا جانبية و لهذا فان البحث عن عناصر طبيعية لمجابهة هذا المرض أصبح مصدر اهتمام الباحثين. الهدف من دراستنا هذه هو تقييم التأثير المضاد لالتهاب القولون (المضاد للالتهاب) للكيتوزان لدى الفئران، تم تفعيل هذا المرض لديهم عن طريق حقن حمض الخل بتركيز 5% تم تقسيم الفئران الى ستة مجموعات: الشاهد (لم يتم تفعيل المرض لديه) مجموعة المراقبة السالبة (تم تفعيل المرض لديه و عدم معالجته)، مجموعة المراقبة الموجبة (تم تفعيل المرض لديه و معالجته بدواء Dexamethasone® (100 مغ/كغ) و مجموعات التجربة اين تم تفعيل المرض و معالجته بتركيز مختلف من الكيتوزان (0.5 / 0.75 / 1 غ/كغ لعلاج مدته 6 أيام. فعالية الكيتوزان قيمت بنتائج مجهرية و اخرى ترى بالعين المجردة. النتائج الإكلينيكية اظهرت ان الكيتوزان بجرعة 1غ/كغ لمجمل العلاج اخفض التلف الذي احدثه حمض الخل بمعدل (3.41 +/- 1.45) مقارنة بمجموعة المراقبة الموجبة التي قلت من الالتهاب بمعدل (6.26 +/- 1.23) نتائج دراسة الأنسجة مجهرية لمجموعة القولونات امكنت من تأكيد مفعول الكيتوزان في اخفاض التقرحات و الالتهاب، و كذلك تمكن من اعادة النسيج البنيوي الى حالته الطبيعية. هذه النتائج سمحت من تأكيد ان الكيتوزان يمتلك فعالية ضد التهاب القولون بفضل خواصه ضد الاكسدة، ضد التعفنت، و ضد الالتهابات و قدرته الشفائية.

الكيتوزان تم وضعه في كبسولات من الجيلاتين حيث تحتوي كل كبسولة على 166مغ من الكيتوزان. و التي خضعت لبعض الكبسولات لبعض الاختبارات الموصوفة من قبل دستور الأدوية الأوروبي والمخصصة لأشكال الصيدلانية الصلبة عن طريق الفم. **الكلمات المفتاحية:** التوصليف، الكيتوزان، التهاب المستقيم، الكبسولات (أمراض الأمعاء الالتهابية المزمنة).

## Abstract

Colitis is a common inflammatory bowel disease with heterogeneous aetiology (genetic and immunological). It is treated with medications such as Dexamethasone® which, in the long term, can cause side effects. For this reason, the development of natural resources to combat this type of disease is the concern of researchers. The purpose of our study was to evaluate the anti-rectocolite (anti-inflammatory) effect of chitosan, induced in albino mice by administration of acetic acid (5%). The mice were separated into six groups: Witness (untreated and not ulcerated), Negative Control Group (ulcerated and untreated), positive control ulcerated and treated with Dexamethasone® (100mg/kg), and the test groups ulcerated and treated with chitosan at different doses (0.5; 0.75 and 1 g/kg) for the entire estimated six-days treatment. The efficacy of chitosan was evaluated by macroscopic and microscopic scores. Clinical scores showed that chitosan at a dose of 1 g/kg for the entire treatment, significantly reduced the damage caused by acetic acid with a score of (3.41± 1.45) compared to positive control which reduced inflammation to a lesser extent (6.26 ±1.23). The histological study of the colons was able to validate the effect of chitosan by decreasing the infiltration of neutrophils and ulcerations in the colon as well as by structural recovery of the mucosa. These results provide evidence that chitosan has a protective effect against RCUH that could be due to its antioxidant, anti-infectious, anti-inflammatory and healing activities.

Chitosan was packaged as gelatin capsules, each capsule contains 166mg. Capsules are subjected to certain tests described by the European Pharmacopoeia and intended for oral solid pharmaceutical forms.

According to his tests carried out the capsules manufactured comply with the standards of the European Pharmacopoeia 9th edition.

**Keywords:** chitosan, characterization, recto colitis, histology, capsules, MICI.