

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

UNIVERSITÉ de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : Matériaux produits Organique industrielle

Etude de stabilité et rhéologie d'une formulation médicamenteuse à base de chitosane

Présenté par :

Mr. Yacoub Badreddine
(Promotrice)

promotrice)

Encadré par :

Mm. S.DJEDRI

Mm.L.Belhadji (Co-

Année universitaire 2015/2016

ملخص

موضوع دراستنا هو استخراج بوليمار طبيعي من بقايا الجمبري الأحمر المسمى الكيتوزان الموجود على مستوى الساحل الجزائري . استخراج هذا الأخير يمر بأربعة مراحل بدءاً بالتخلص من المعادن, التخلص من البروتينات, التبييض, و أخيراً التخلص من مجموعة الاستيل. الذي تحصلنا عليه قدر ب 93% وذوبانه في تركيز ضعيف لحمض الاستيك.

و قد تم تمييز المنتج المتحصل عليه بواسطة تحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء, حيود الأشعة السينية, المجهر الإلكتروني الماسح و النشاط الميكروبيولوجي .

في إطار تطوير المعلقات الدوائية في الصواغات ذات التحرير الممدد مكونة من نوعين من السكريات الجينات الصوديوم و الكيتوزان.

هذه الدراسة قائمة على إجراء أبحاث أولية على المعلقات تحت تأثير الكيتوزان على الخصائص الريولوجية و الأستقرارية لهذه الأخيرة .

وبهدف الحصول على نتائج ملائمة قمنا باتباع بروتوكول تجريبي يسمح لنا بتعيين المعلقات التي تملك استقرارية مناسبة .

Résumé

L'objectif de notre étude est basé sur l'extraction d'un bio polymère à partir des carapaces de crevette rouge (de la région méditerranéenne). La déminéralisation, déprotéinisation, décoloration et enfin une désacétylation nous ont permis d'obtenir du chitosane.

Le produit obtenu a été caractérisé par diffraction des rayons X (DRX), la microscopie à balayage électronique (MEB) ainsi que l'analyse de son activité micro biologique. On a obtenu un (DDA) de 93 % et sa solubilité à une très faible concentration d'acide acétique.

Dans le cadre de développement d'une suspension médicamenteuse à libération prolongée. La formulation a été effectuée en tenant compte de deux polysaccharides, le premier est de l'alginate de sodium commerciale et le deuxième est le chitosane extrait à partir de la carapace de crevette.

Une étude préliminaire de la suspension sous l'effet de chitosane afin de mettre en évidence les caractéristiques rhéologiques et de stabilité ont été réalisées. Afin de minimiser le nombre d'essais la méthode des plans d'expérience a été adoptée.

pour obtenir les meilleures estimations possibles. La plupart des suspensions obtenue présentent une bonne stabilité.

Abstract

The aim of this study is based on the extraction of a polymeric bio starting from the red shrimp carapaces (of the Mediterranean area). Demineralization, deproteinisation, discoloration and finally a desacetylation have enables to us to obtain chitosane.

The product obtained was characterized by diffraction of x-rays (DRX), the electronic scanning microscopy (MEB) as well as the analysis of its biological micro activity. We obtained one (DDA) of 93% and his solubility with a very low concentration of acetic acid.

Within the framework of development of a medicamentous suspension with prolonged release. The formulation was carried out have taking account of two polysaccarides, first is sodium alginate commercial and the second is the chitosane extracted starting from the shrimp carapace.

A preliminary study of the suspension under the effect of chitosane in order to highlight the rheological characteristics and of stabilities was carried out. In order to minimize the number of tests the method of the experimental designs was adopted to obtain the best possible estimation. The majority of the obtained suspensions have a good stability.

Dédicaces

Merci à ma chère mère
mes frères mes sœurs et à
toute ma

Familles et toutes mes
amies Je dédie ce travail à
eux

pour leur amour, soutien et
encouragements.

REMERCIEMENTS

Nous remercions tout d'abord « **ALLAH** » le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté, la santé et la patience de mener à terme ce présent travail.

A Mme. BELHADJI Linda, Qui nous a confié ce travail. Sa gentillesse et sa disponibilité tout au long de notre master nous ont permis de réaliser ce travail dans de bonnes conditions. Merci pour ses longues discussions, ses précieux conseils et son soutien.

Trouvez ici le témoignage de nos profondes gratitudee.

A Mme. DJEDRI Safia,

Vous avez contribué par votre constante disponibilité et vos conseils à l'élaboration de ce mémoire. Nous avons apprécié l'ampleur de vos connaissances alliées de grandes qualités humaines.

Nous vous adressons tous nos respects.

A tous les membres de jury,

Pour l'honneur que vous nous faites de siéger dans notre jury.

Nous vous prions de trouver ici l'expression de notre sincère gratitude pour les critiques que vous allez nous formuler.

En fin, je remercie ma **FAMILLE**, mes **AMIS** et tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
-----------------------------	---

CHAPITRE 01: MEDICAMENTS ET SUSPENSIONS

1.1. Définition du médicament :	4
1.2. Origine des médicaments :	4
1.3. Composition d'un médicament :	4
1.4. Le devenir du médicament dans l'organisme :	5
1.5. Action des médicaments :	5
1.6. Classement des médicaments par voie d'administration :	6
1.7. Les systèmes dispersés :	7
1.7.1. Les émulsions :	8
1.7.2. Les suspensions :	8
1.7.2.1. Classification des suspensions :	8
1.7.2.2. Avantages et inconvénients :	10
1.7.2.3. Les caractéristiques désirées dans les suspensions pharmaceutiques.....	11
1.7.2.4. Application	12
1.7.2.5. Physico-chimie des suspensions	12
1.8. La formulation des suspensions	15

CHAPITRE 02: ALGINATE DE SODIUM ET CHITOSANE

2.1. La chitine :	18
2.2. Le chitosane :	18
2.2.1. Définition du chitosane :	18
2.3. Origine de la chitine et du chitosane :	19
2.4. Propriétés physicochimique du chitosane :	20
2.5. Comportement du chitosane en milieu acide :	21
2.6. Propriétés de biocompatibilité du chitosane :	22
2.7. Propriétés biologiques :	23
2.7.1 Propriétés antibactériennes :	23
2.7.2. Propriétés antifongiques :	25

2.7.3. Propriété cicatrisante du chitosane :	25
2.7.4. Propriétés antivirales :	26
2.7.5. Propriétés antitumorales :	26
2.7.6. Propriétés anti oxydantes :	27
2.8. Effet du chitosane dans une formulation :	27
2.8.1. Effet gélifiant :	27
2.8.2. Effet viscosifiant:	27
2.9. Application du chitosane :	28
2.10. Alginate de sodium :	29
2.11. Propriétés physico-chimique d'alginate de sodum:	30

CHAPITRE 03:PARTIE EXPERIMENTALE

3.1. Matériels et méthodes	34
3.1.1. Produits utilisés pour l'obtention du chitosane :	34
3.1.2. Extraction de la chitine :	34
3.1.3. Préparation du chitosane :	36
3.1.4. Caractérisation physico-chimique du chitosane :	36
3.1.5. Préparation de la suspension:	39
3.1.6. Description de matières premières utilisées:	39
3.1.7. Pré-formulation :	40
3.1.8. Formulation :	42
3.1.9. Caractérisation physico-chimique de la formulation :	46
3.1.9.1. Test de gélification in situ:	47
3.1.9.2. Caractérisation rhéologique :	47
3.2. Résultats et discussion	49
3.2.1. Préparation de la matière première :	49
3.2.2. Caractérisation physicochimique de la carapace brute de crevettes :	50
3.2.2.1. Détermination de teneur en eau, cendres et lipides :	50
3.2.2.2. Détermination de la solubilité :	50
3.2.2.3 Détermination du degré de désacétylation et du pKa par titrage potentiométrique	51
3.2.2.4. Mesure du degré d'acétylation par IR-TF :	53
3.2.2.5. Caractérisation par diffraction rayon X (DRX) :	54
3.2.2.6 Caractérisation par microscope électronique à balayage :	55

3.2.2.7. Résultats d'activité microbiologique de chitosane :	57
3.2.3. Caractérisation physico-chimique de nos formulations :	59
3.2.3.1. Résultat du contrôle du pH et mesure de la densité :	59
3.2.3.2. Résultats du test de gélification in-situ :	60
3.2.3.3. Résultats de l'étude rhéologique des suspensions :	61
3.2.3.4. Résultats du contrôle de la stabilité des suspensions :	64
3.2.3.5 Résultats du contrôle de la stabilité des suspensions par rhéologie:	65
Conclusion	67

Liste des figures

Figure 1.1: Schéma représentatif d'un système dispersé.....	8
Figure 1.2 : Représentation de la sédimentation : (a) dispersion dèfloculée, (b) dispersion floculée.	10
Figure 1.3 : Différentes structures des particules en suspension.	13
Figure2.1 : Structure chimique de la chitine.....	18
Figure2.2 : Structure chimique de chitosane.	19
Figure 2.3 : Structures du chitosane en milieu acide (A) et en milieu neutre (B).	22
Figure 2.4: Monomère de la chaine alginat de sodium.	29
Figure2.5 : Structure chimique de la chaine d'alginat de sodium.....	29
Figure2.6 : Les interaction ionique entre le groupe anionique (-COO ⁻) d'alginat de sodium et le groupe cationique (-NH ₃ ⁺) de chitosane.....	30
Figure 3.1: structure de Ranitidine.	40
Figure 3.2 : Dispositif expérimental utilisé pour la gélification in-situ.....	47
Figure 3.3 : Courbe du dosage pH métrique du chitosane extrait.....	52
Figure 3.4 : dérivée seconde du dosage potentiométrique du chitosane extrait.....	53
Figure 3.5 : Spectre IR-Rouge d'extrait et commerciale.	53
Figure 3.6 : Diffractogramme de chitosane commerciale et extrait.	54
Figure 3.7 : Image par microscope électronique à balayage du chitosane commerciale à différent dimensions : 100 μm , 50 μm ,20 μm	55
Figure3.8 : Image par microscope électronique à balayage du chitosane extrait à différent dimensions : 100 μm , 50 μm ,20 μm	56
Figure 3.9 : Image du gel d'alginat de sodium et du chitosane.	61
Figure 3.10 : Evolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour les différentes suspensions.	62
Figure 3.11 : Courbe d'écoulement de viscosité de l'essai n°01.	63
Figure 3.12 : Evolution du module de conservation en fonction de la fréquence angulaire pour les différentes suspensions.....	66

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Voies et formes d'administration des médicaments.	6
Tableau 1.2. Avantages et inconvénients des médicaments par voie orale	7
Tableau 1.3. Avantages et inconvénients des suspensions	11
Tableau 2.1: Les hypothèses d'action antibactérienne de chitosane.	24
Tableau 2.2 : Les différents champs d'application du chitosane.....	28
Tableau 2.3 : Application biomédical du chitosane.	29
Tableau 2.4. Répartition de l'alginate de sodium pour les différents secteurs industriels et exemples d'applications.	32
Tableau 3.1 : Les produits chimiques utilisés lors de l'extraction du chitosane	34
Tableau 3.2: Les matières Premières utilisées.....	39
Tableau 3.3 : Les formules qualitative et quantitative utilisés lors des essais de Pré- formulation.....	41
Tableau 3.4 : Caractérisation du produit selon les réponse et moyens de mesure	44
Tableau 3.5 : Facteurs retenus et intervalles de variation.....	44
Tableau 3.6 : La matrice d'expériences générée.	46
Tableau 3.7: Les résultats des caractéristiques de chitosane.	50
Tableau 3.8: Test de solubilité du chitosane extrait et du chitosane commercial.	50
Tableau 3.9 : Résultats du test de solubilité du chitosane extrait et commerciale à différentes concentrations d'acide acétique.	51
Tableau3.10 : l'activité microbiologique du chitosane à 1 %.	57
Tableau 3.11 : l'activité microbiologique du chitosane à 1.5 %.	58
Tableau 3.12 : l'activité microbiologique du chitosane à 2 %	58
Tableau 3.13 : Les résultats de mesure du pH et les densités des formulations.....	60
Tableau 3.14 : Résultats de l'étude de stabilité effectuée sur les suspensions issues de la matrice d'expérience	64

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES

ABREVIATIONS

PA : Principe actif

GI : Gastro-intestinal

LP : Liberation prolongé

pH : Potentiel hydrogène

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

Chi : Chitosane

DDA : Le degré de désacétylation

MM : Masse moléculaire

DRX : *diffraction rayon X*

BET : théorie Brunauer, Emmett et Teller

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique

Alg : Alginate de sodium

Qs : Quantité suffisante

R : Ranitidine

UV-VIS : Spectroscopie ultraviolet-visible

R² : Coefficient de détermination

Q² : Coefficient de prédiction

IR : Infrarouge

NOMENCLATURES

Symbole	Nomenclatures	Unité
$\dot{\gamma}$	Vitesse de cisaillement	[s ⁻¹]
G'	Module de conservation	[Pa]
G''	Module de perte ou de dissipation	[Pa]
η_0	Viscosité a un taux de cisaillement nul	[Pa.s]
η_∞	Viscosité a un taux de cisaillement infini	[Pa.s]
τ_0	Contrainte de cisaillement	[Pa]
D	Densité relative	

INTRODUCTION GENERALE

La voie orale d'administration des médicaments, étant le moins coûteux et la plus sûre que d'autres itinéraires, est considérée comme la plus pratique de l'administration du médicament. Les formes posologiques orale comprennent conventionnelles et les produits à libération prolongée. Toutefois, la formulation à libération prolongée Orale présente de nombreux avantages par rapport aux formes posologiques conventionnelles. Ils n'ont été prouvés à augmenter l'observance des patients, réduire les effets indésirables, d'améliorer la tolérance, d'accroître l'avantage thérapeutique et de réduire les coûts des soins de santé.

L'utilisation de la technologie de la libération contrôlée dans la formulation pharmaceutique de nouveaux produits devient de plus en plus importante. La libération contrôlée de principe actif implique l'application des domaines de la chimie physique. En effet, il s'agit de concevoir des formes galéniques correctement caractérisées et reproductibles, qui contrôlent l'entrée du principe actif dans l'organisme selon les caractéristiques du profil exigé de la délivrance du médicament.

L'objectif ce travail, est de mettre au point une suspension médicamenteuse à base de Principe Actif et dont la libération du PA est prolongée. Le mécanisme de cette libération est basé sur une gélification de la matrice in situ, par complexation des macromolécules de l'Alginate de sodium par une source de cations divalents de Chitosane qui sont libérés dans le milieu acide de l'estomac.

Cette étude consiste à la réalisation d'une caractérisation de la suspension de référence, suivie d'une étude préliminaire sur l'effet du chitosane sur les caractéristiques rhéologiques, bio pharmaceutiques et stabilisante des suspensions préparées. Finalisant par une étude d'optimisation de la formule en s'appuyant sur la planification statistique et en faisant varier les concentrations de l'Alginate de sodium ainsi que le Chitosane l'intervalle de variation de sa concentration a été déjà cerné lors de l'étude préliminaire Le travail qui a fait l'objectif de ce mémoire est organisé en deux parties :

- La première partie consiste en une synthèse bibliographique, dans laquelle est rassemblée des informations scientifiques et des notions sur les suspensions médicamenteuse d'une manière générale, ainsi que des généralités à-propos de l'estomac et les polymères utilisés.

➤ La deuxième partie consiste à l'étude expérimentale, les différentes méthodes ont utilisées pour la caractérisation des polymères utilisées dans la formulation de notre suspension ainsi des tests de rhéologie et de stabilité sur la suspension. Enfin, nous terminons le travail par une conclusion des travaux obtenus suivis des perspectives.

CHAPITRE 01

MEDICAMENTS ET

SUSPENSIONS

Introduction

Les médicaments existent sous différentes formes pharmaceutiques, l'une des formes les plus courantes sur laquelle sont présentées un nombre important de substances médicamenteuses sont les systèmes dispersés ou figurent les suspensions, qui est une forme plus au moins difficile à mettre en œuvre, vue les formes d'instabilité qui peuvent présenter.

Dans ce chapitre nous allons exposer en premier temps les différents types de médicament ainsi que les propriétés des systèmes dispersés, des suspensions, les méthodes des systèmes matriciels utilisés pour la formulation des suspensions.

1.1. Définition du médicament :

On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques[1].

Un médicament agit par l'intermédiaire d'un ou plusieurs constituants appelés principes actifs (substances réellement actives), qui sont associées à des excipients (substances non actives qui permettent la préparation et l'administration du médicament).

1.2. Origine des médicaments :

L'origine des médicaments peut être :

- Végétal : extraction des huiles à partir des plantes.
- Animal : extraction des hormones polypeptidique à partir du sang humain (insuline).
- Synthétique : par synthèse directe ou par hémi-synthèse (certaines pénicillines).
- Biologique : domaine du génie génétique [2].

1.3. Composition d'un médicament :

Un médicament est composé principalement d'un ou plusieurs principes actifs et d'excipients.

- **Principe actif :** C'est un composé chimique, d'origine organique ou minérale qui confère au médicament son activité thérapeutique.
- **Excipient :** désigne toute substance autre que le principe actif, présent dans un médicament ou utilisé pour sa fabrication, Son addition est destinée à conférer une consistance donnée, ou d'autres caractéristiques physiques ou gustatives (gout) particulières, au produit final, tout en évitant toute interaction, particulièrement chimique, avec le principe actif. Un excipient n'est donc pas défini par une composition chimique particulière mais par son utilisation, qui découle de ses propriétés physico-chimiques qui le rendent apte à remplir son rôle d'excipient. Sans excipient, pas de médicament [3].

1.4. Le devenir du médicament dans l'organisme :

L'étude du devenir du médicament dans l'organisme en fonction du temps est appelée la pharmacocinétique, c'est la vitesse à laquelle la substance active du médicament va être absorbée, distribuée dans l'organisme, métabolisée (transformée), puis éliminée de l'organisme. Elle conditionne la méthode de prise : orale (par la bouche), intraveineuse ...etc, le nombre quotidien de prises, leur horaire, la dose journalière (quotidienne). Par opposition à la pharmacodynamique qui est l'étude de l'effet des médicaments sur l'organisme (l'étude de son action sur l'organisme) [4].

1.5. Action des médicaments :

Certains médicaments apportent des substances de substitution (sels minéraux, hormones, vitamine D contre le rachitisme, insuline contre le diabète sucré) et soignent les maladies de carence, c'est-à-dire les maladies dues à l'absence ou à l'insuffisance de ces substances.

Les médicaments anti-infectieux inhibent la reproduction des microbes ou les tuent (antiseptiques, antibiotiques). D'autres médicaments détruisent les cellules anormales, telles les cellules cancéreuses (antineoplasiques).

Indépendamment de leur but, tous les médicaments n'agissent pas dans les mêmes délais. Certains ont un effet très rapide ou quasi immédiat (trinitrine contre l'angine de poitrine, adrénaline contre la crise d'asthme). D'autres, à l'opposé, ont parfois besoin de plusieurs semaines pour atteindre leur plein effet (antidépresseurs).

1.6. Classement des médicaments par voie d'administration :

Il existe plusieurs voies d'administration des médicaments qui, toutes ont des avantages et des inconvénients. Lorsqu'on recherche un effet général, le médicament est administré par voie buccale ou parentérale représenté dans le tableau 1.1. Si l'on veut obtenir un effet local, on utilise des préparations spéciales comme les collyres, les pommades [05].

Tableau 1.1. Voies et formes d'administration des médicaments.

Voie d'administration	Forme des médicaments
Voie orale	Solides : - Comprimés, granulés - Gélules, capsules -Poudres orales Liquides : -Sirops -Ampoules -Suspensions et solutions buvables
Voie cutanée	-Pommades, pâtes -Crèmes, geles
Voie rectale	-Les suppositoires, pommades rectale -Suspensions et solution a usage rectale
Voie oculaire	-Collyres -Pommades ophtalmiques
Voie parentérale (IV, IM, SC)	-Préparations injectables liquides (solutions, émulsions, suspensions)[05].

- **Avantages/ inconvénients de voie d'administration orale :**

Les suspensions présentes parfois des avantages mais aussi des inconvénients. Le tableau 1.2 suivant donne quelques avantages et inconvénients [06].

Tableau 1.2. Avantages et inconvénients des médicaments par voie orale

AVANTAGES	INCONVENIENTS
-L'administration de médicament est aisée. -Elle est bien acceptée par le patient.	-Les médicaments peuvent être dégradés par divers enzymes ou être excrétés par voie biliaire -Il y a irritation du tube digestif par certains médicaments (anti-inflammatoires,..), la voie orale donc à éviter en cas d'ulcère gastroduodéal.

1.7. Les systèmes dispersés :

Les systèmes dispersés constitués d'au moins deux phases : la substance qui se trouve dispersé est connue sous le nom de dispersés ou interne, et une phase continue ou externe. En se fondant sur la taille des particules de la phase dispersée, dispersions sont généralement classées comme des dispersions moléculaires, des dispersions colloïdales, et dispersions grossières.

Les dispersions moléculaires ont dispersé les particules inférieures à 1 nm en taille. Dispersions colloïdales ont des tailles de particules entre 1 nm et 1 mm. Comme présenté dans la figure 1.1 microémulsions, les nanoparticules, les microsphères sont quelques exemples des dispersions colloïdales.

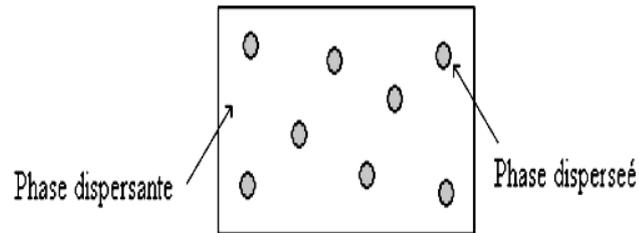


Figure 1.1: Schéma représentatif d'un système dispersé.

Il existe alors deux types de dispersions :

1.7.1. Les émulsions :

Une émulsion est la dispersion d'un liquide en fines gouttelettes dans un autre liquide. Ces deux liquides doivent être non miscibles et avoir des solubilités différentes. Le liquide sous forme de gouttelettes est appelé phase dispersée (ou discontinue), tandis que l'autre liquide est appelé phase dispersante (ou continue). Les émulsions sont considérées comme étant des systèmes dispersés [05].

1.7.2. Les suspensions :

Une suspension est un système formé d'un liquide dans lequel sont immergés de petites particules solides insolubles, où le liquide constitue la phase continue et les espèces solides, la phase dispersée [07].

- Une phase liquide, continue, dispersante
- Une phase solide, discontinue, dispersée.

Les suspensions sont utilisées pour la voie orale, soit parce que le principe actif ne peut être dissout dans l'eau, soit parce que sa forme en insoluble est préférée, du fait que sa saveur est très désagréable lorsqu'il est solubilisé [08].

1.7.2.1. Classification des suspensions :

Une classification générale des suspensions selon leurs propriétés est très difficile, car ces dernières peuvent changer sur une large gamme.

Le degré de dispersion de la phase solide, l'interaction entre la phase dispersée et le milieu de dispersion, et l'interaction entre les particules sont les critères principaux pour la classification des suspensions [09].

A. Selon leur mode d'administration

- Suspensions orales
- Suspensions parentérales
- Les lotions [08]

B. Selon la taille des particules de la phase dispersée

On distingue deux grandes catégories de suspensions selon les dimensions des particules.

- **Suspensions colloïdales**

Ce sont des suspensions translucides avec des tailles de particules inférieures à $1\mu\text{m}$. Dans ces dispersions très fines, le mouvement Brownien dû à l'agitation thermique a un effet plus grand que la sédimentation sous l'effet de la gravité, donc ces dispersions ne se séparent pas spontanément. Pour les séparer, il faut employer des moyens physico-chimiques, qui font agréger les particules, ou bien appliquer une accélération centrifuge très forte [10].

- **Suspensions brutes**

Ce sont des suspensions laiteuses avec des tailles de particules supérieures à $1\mu\text{m}$. Les particules de grandes tailles, dispersées dans un liquide sédimentent sous l'effet de la gravité. Si l'on veut conserver l'homogénéité de la dispersion, il faut les suspendre, soit par agitation mécanique ou par blocage des mouvements dans le liquide (utilisation d'un gélifiant) [10].

C. Selon la Concentration en espèces solides

- Les suspensions diluées et semi-diluées ; une suspension diluée se caractérise par une très faible fraction volumique en espèces solide. (Solide de 2 à 10 % m/v).
- Les suspensions concentrées ; la fraction volumique en espèces solide est environ de 50 % m/v [07].

D. Par la nature électrostatique des particules

Ces systèmes sont classés en tant que systèmes réversibles ou irréversibles [10] :

- **Suspension floclée**

Lorsque le précipité occupe une place importante dans le flacon, avec un surnageant limpide, la suspension est dite **Floclée**, elle est utilisable car une légère agitation permet d'obtenir une suspension homogène

- **Suspension défloclée**

Lorsque le précipité a un aspect compact au fond du flacon, avec un surnageant trouble, la suspension est dite **défloclée**, elle est à rejeter car la remise en suspension ne sera que partielle si on agite. Une croûte restera collée au fond du flacon (phénomène de *caking*), qui ne se remettra jamais en suspension, ce qui implique qu'une partie de la dose du médicament est perdue. le phénomène de sédimentation est représenté dans la figure 1.2.

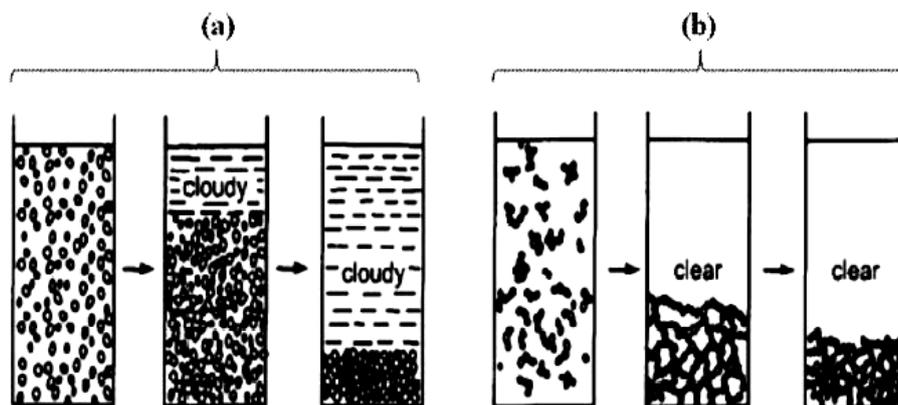


Figure 1.2 : Représentation de la sédimentation : (a) dispersion défloclée, (b) dispersion floclée.

1.7.2.2. Avantages et inconvénients :

Les suspensions présentent parfois des avantages mais aussi des inconvénients. Le tableau 1.3 donne quelques avantages et inconvénients de ces dernières [11].

Tableau 1.3. Avantages et inconvénients des suspensions

AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
<p>- La suspension peut améliorer la stabilité chimique de certains médicaments.</p> <p>-Le médicament en suspension présent un taux de biodisponibilité plus élevé que d'autres formes galéniques. L'ordre décroissant de la biodisponibilité ; solution > suspension > capsule > comprimé enrobé.</p> <p>-la suspension peut masquer le gout désagréable de médicament</p>	<p>-Il est difficile de formuler les suspensions.</p> <p>-Une dose uniforme et précise ne peut être atteinte que si la suspension est conditionnée sous forme de doses unitaires.</p> <p>-Complexité à maîtriser les facteurs régissant la stabilité physique des suspensions, phénomènes de sédimentations.</p>

1.7.2.3. Les caractéristiques désirées dans les suspensions pharmaceutiques

1. Les particules en suspension ne devraient pas être déposées rapidement et le sédiment formé doit être facilement remis en suspension en employant une simple agitation.
2. Une suspension pharmaceutique devrait avoir des caractères organoleptiques agréables (odeur, couleur et le goût).
3. Elle devrait être physiquement, chimiquement et microbiologiquement stable.

[11]

1.7.2.4. Application

La suspension est généralement applicable [11]:

- Lorsque le principe actif est insoluble ou peu soluble.
- Pour empêcher la dégradation de principe actif ou pour améliorer sa stabilité.
- Pour masquer le goût amer du principe actif.
- La suspension peut être formulée pour une application parentérale, afin de contrôler le taux d'absorption de principe actif.
- Des vaccins, en tant qu'agent d'immunisation sont souvent formulés sous forme de suspension (exemple : vaccin de choléra).

1.7.2.5. Physico-chimique des suspensions

A. Stabilité d'une suspension

La formulation d'une suspension implique des connaissances théoriques liées à la technologie permettant d'obtenir des propriétés optimales du point de vue pharmacologique et physico-chimique. Parmi les paramètres les plus importants qu'il faut connaître et qui régissent la stabilité des suspensions : la taille des particules, le mouillage, et la sédimentation [12].

➤ La taille des particules

En suspension, la taille des particules du principe actif dispersées est le facteur le plus important permettant de gérer sa biodisponibilité. A la différence des comprimés et des capsules, la dissolution des particules du principe actif en suspension ainsi que leur absorption commence dès leur dilution dans les fluides contenus dans le tube digestif. Les particules finement divisées se dissolvent à un taux plus grand et ont des solubilités relatives plus élevées que les grosses particules.

La taille moyenne admise pour les particules en suspension va de 1 à 50 μm . la réduction de la taille des particules entraîne une augmentation de l'air interfaciale, cette augmentation influe sur la vitesse de dissolution du principe actif.

Toutefois, Les particules en suspension ont tendance à s'agréger ou à s'agglomérer pour former des objets relativement gros (figure 1.3) [12].

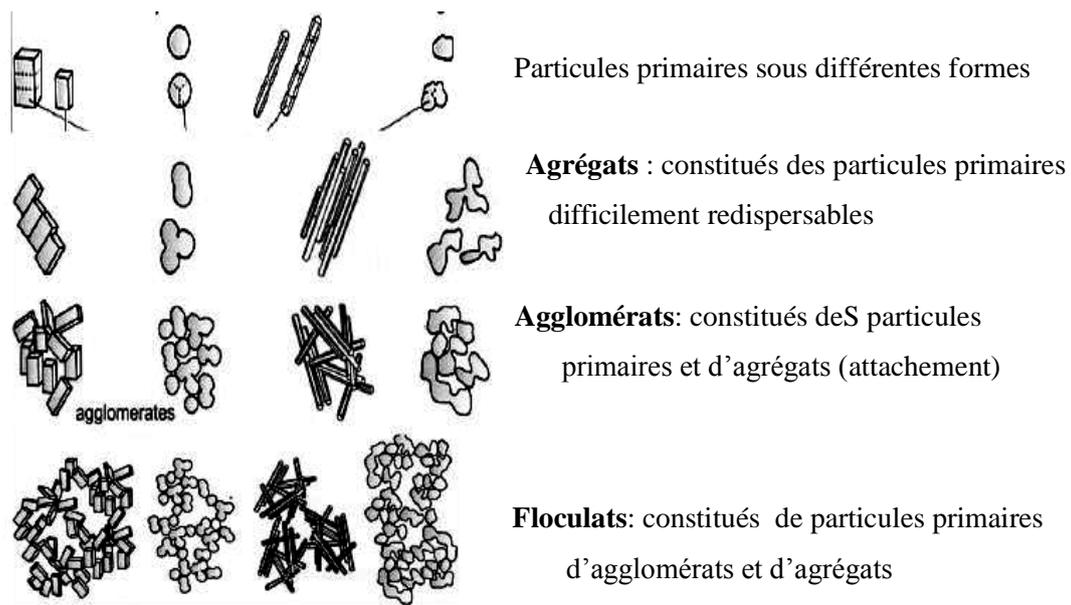


Figure 1.3 : Différentes structures des particules en suspension.

Lorsque la taille des particules est au-dessous de 10 μm , l'augmentation de l'énergie due à la cohésion des petites particules, devient un facteur important qui parasite la réduction de la taille. Les colloidmills (broyeurs colloïdaux) et les homogénéisateurs sont souvent employés à la fin de la préparation des suspensions pour casser et affiner les particules qui sont mal mouillées ou celles qui sont toujours sous forme d'agrégat ou d'agglomérat [12].

➤ **Mouillage des particules**

L'introduction des particules dans un véhicule est une phase importante de la préparation des suspensions. Lorsque ces particules sont très hydrophobes, elles sont recouvertes d'une mince couche d'air, elles ne peuvent être mouillées par le véhicule et auront une tendance à s'agglomérer et à flotter à la surface. On peut quelques fois éliminer cet air par agitation mais le plus souvent on a recours à l'addition d'un agent mouillant [12].

➤ **Sédimentation des particules**

La sédimentation est un phénomène de migration des particules. Lorsque l'effet de la gravité est prépondérant, les particules solides dispersées ont tendance à sédimenter [07].

- Pour un sédiment dèfloculé, les particules précipitent séparément du fait des forces de répulsion qui les éloignent les unes des autres. Elles se déposent au fond du récipient en chassant le liquide interstitiel. Il se crée alors des liaisons interparticulaires. Le sédiment est peu volumineux et compact [13].

- Par ailleurs, pour les systèmes floculés où les barrières d'énergie répulsives ont été réduites, les particules se lient entre elles sous formes de flocons dans les quels est emprisonnée une certaine quantité de liquide. Chaque flocon précipite à une vitesse qui dépend de sa taille et de sa porosité. Le sédiment formé par l'accumulation de flocons est très volumineux, poreux et facile à redisperser [13].

B. Techniques de stabilisation des suspensions

➤ **Stabilisation stérique** (Ajout de Polymères)

Cette méthode de stabilisation consiste à ajouter de macromolécules de type non-ionique, qui s'absorbent à l'interface des particules solides. Ces couches macromoléculaires agissent en créant une barrière physique qui fait augmenter la distance entre les particules [14].

➤ **Stabilisation électrostatique**

Dans un milieu aqueux, une particule acquiert une charge électrique en surface qui dépend de la structure de la particule, de la présence de groupements ionisables et/ou de l'adsorption sélective d'ions présents dans le milieu. Il apparait alors une charge superficielle, positive ou négative selon le pH du milieu. Les ions avec une charge de signe opposé à celle de la particule (contre-ions) vont se concentrer autour de la surface, tandis que les ions avec la charge de même signe (Co-ions) seront repoussés vers l'extérieur. Lorsque deux particules, chargées se rapprochent, chacune avec sa charge ionique, l'interpénétration des doubles couches électriques va générer un potentiel de répulsion électrostatique. A noter que l'ajout de sel au système fait

augmenter la force ionique, ce qui restreint la double couche en réduisant la portée de la répulsion [15].

➤ **Stabilisation rhéologique**

Il s'agit de l'incorporation d'additifs qui permettent d'augmenter la viscosité de la phase continue, tels que les polymères viscosifiants, de manière que les particules dispersées soient moins mobiles et que la probabilité de choc diminue [15].

1.8. La formulation des suspensions

Formulation d'un produit pharmaceutique en suspension requiert une connaissance des propriétés de la phase dispersée et la dispersion moyenne. Le matériel pour la formulation des suspensions devraient être soigneusement sélectionné en tenant compte de la voie d'administration, application prévue, et les effets nocifs possibles. Les éléments suivants sont les facteurs les plus importants à prendre en considération lors de la formulation de suspension parapharmaceutique :

- La nature des matières en suspension : les propriétés inter faciales de la suspendue matériel sont un important facteur à prendre en considération lors de la formulation d'une suspension. Les particules qui ont de faibles tensions inter faciales sont facilement mouillées par l'eau. Des particules de matériaux à haute tension inter faciale, toutefois, ne sont pas facilement mouillées. La suspension de ces matières est normalement atteinte par l'utilisation d'agents tensio-actifs. Les surfactants accroître la mouillabilité des particules en réduisant leur tension superficielle.
- Taille de particules en suspension : réduction de la taille des particules entraîne une diminution du taux de sédimentation des particules en suspension comme expliqué par la loi de Stoke. Réduction de la taille des particules peut être obtenue par des procédés comme le broyage, le tamisage. La taille des particules affecte également le taux et le degré d'absorption, dissolution, et la bio-distribution du médicament. Toutefois, la réduction de la taille des particules au-delà d'une certaine limite peut provoquer la formation d'un gâteau compact sur la sédimentation.

- Viscosité de la dispersion moyenne : une viscosité supérieure de dispersion moyenne offre l'avantage d'une sédimentation plus lente; cependant, elle peut compromettre d'autres propriétés souhaitables comme seringabilité pour suspensions parentérale, Propagation pour suspensions d'actualité, la facilité d'administration pour suspensions orales. La propriété de la fluidification est hautement souhaitable, afin que la suspension soit très visqueuse pendant le stockage et a une faible viscosité après agitation (haute résistance au cisaillement) afin de faciliter portabilité à la bouteille.

CHAPITRE 02

ALGINATE DE

SODUIM ET

CHITOSANE

Introduction

Les bio-polymères se définissent comme étant des biomacromolécules synthétisées par des organismes vivants. Et selon l'ADEME (Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie), les biopolymères sont des polymères naturels issus de ressources renouvelables de plantes, d'algues ou d'animaux.

Dans ce chapitre nous allons aborder les différents excipients utilisés dans notre formulation tel-que le chitosane comme véhiculé ainsi sur le biopolymèrealginate de sodium comme étant un complexant.

2.1. La chitine :

La chitine est un polymère de glucose composé du monomère N-Acétyl-D-Glucosamine. Plus précisément, ce sont des molécules de glucoses dont un groupement N-Acétyle est attaché au carbone 2 du sucre. Les monomères sont reliés entre eux par des liens β 1, 4 (voir figure 2.1). La chitine se retrouve rarement à l'état pur dans la nature. La plupart du temps, elle forme des liens faibles non-covalents avec des protéines des organismes qui l'ont produite. La chitine est un polymère insoluble dans les solvants organiques. Elle ne peut être dissoute que dans des solutions d'acides très concentrées (environ plus de 98% pour la chitine α dans les crustacés et entre 88%-90% pour la chitine β dans les mollusques) [16]

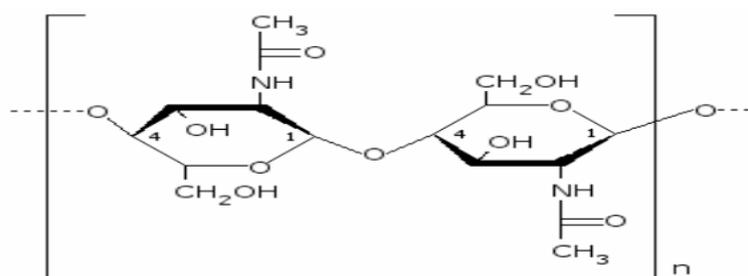


Figure2.1 : Structure chimique de la chitine.

2.2. Le chitosane :

2.2.1. Définition du chitosane :

La désacétylation de la chitine par l'hydroxyde de sodium va donc permettre d'obtenir le chitosane de formule chimique poly(β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose présenté dans la Figure 2.2. Le degré de désacétylation (DDA) va

alors définir la proportion de groupements amines devant les groupements acétyles qui constituent les chaînes du chitosane. On pourra utiliser le terme de chitosane lorsque le DDA aura dépassé 50 %, en-dessous on parle toujours de chitine. Le chitosane est donc presque toujours un copolymère à moins que le DDA ne soit de 100 %. [17].

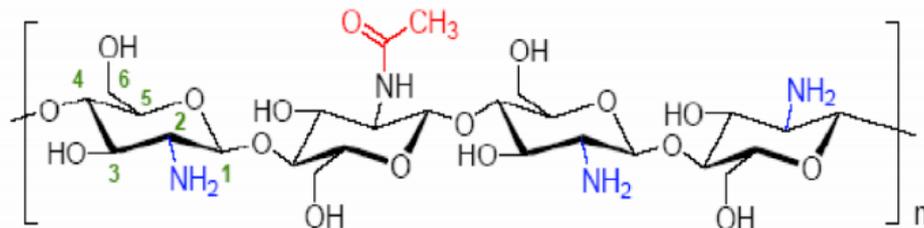


Figure2.2 : Structure chimique de chitosane.

2.3. Origine de la chitine et du chitosane :

- **Origine animal :**

La chitine et le chitosane sont présents au sein d'une pléiade d'organismes. Les membranes cellulaires de certaines bactéries contiennent de la chitine. Chez d'autres bactéries, les membranes contiennent exclusivement du chitosane. La chitine se retrouve chez de nombreuses espèces de champignons dans des proportions allant jusqu'à 45 %. Les carapaces d'insectes, de scorpions et d'araignées contiennent de 20 à 60 % de chitine. Les exosquelettes de crustacés sont largement composés de chitine. La proportion massique de chitine post-décalcification et déprotéinisation est de l'ordre de 80 %. Chez les décapodes, comme la crevette, la chitine représente 8,8 % de la masse totale humide de l'organisme.

- **Origine synthétique :**

Les principales sources industrielles de chitine et de chitosane sont les exosquelettes de crustacés provenant de l'industrie de la transformation du crabe et de la crevette. Selon les données du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec et en considérant le pourcentage de chitine très élevés, la quantité de chitine qui pourrait potentiellement être extraite par les usines québécoises de transformation de la crevette serait de 650 tonnes par ans.

- **Origine végétal :**

En outre les sources citées précédemment, la chitine a aussi été isolée d'un grand nombre d'organismes marins dont les algues, les mollusques et les céphalopodes.

2.4. Propriétés physicochimique du chitosane :

- **Masse moléculaire :**

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

- **Degré de désacétylation :**

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

- **Solubilité :**

En général, la solubilité du chitosane dépend de la valeur de DDA, de la force ionique, du pH, de la nature de l'acide utilisé et de la distribution des groupes acétyles le long de la chaîne macromoléculaire. En général, un chitosane avec un DDA supérieur à 70 % est utilisé pour augmenter sa solubilité. De plus, la solubilité du chitosane augmente lorsque la masse molaire diminue. Et aussi la solubilité augmente à un pH=1,2 acide .

- **Viscosité :**

La viscosité est une caractéristique importante du chitosane concernant son comportement en solution. Cette caractéristique est liée à la conformation des chaînes

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

- **Cristallinité :**

La cristallinité est un paramètre important car elle contrôle un certain nombre de propriétés comme l'accessibilité des sites internes dans les chaînes macromoléculaires, les propriétés de gonflement dans l'eau ou encore les propriétés diffusionnelles. La cristallinité est en général déterminée par des mesures de diffraction de rayons X. En fait, le chitosane est généralement une substance semi-cristalline. Il cristallise dans le système orthorhombique et deux types de produits sont connus : le chitosane I (faible DDA, sous forme de sel) est plus désordonné que le chitosane² (fort DDA, forme amine libre).

2.5. Comportement du chitosane en milieu acide :

Le chitosane est soluble dans des solutions aqueuses acides et insoluble à un pH neutre ou alcalin. Dans un milieu acide, les groupes amines ($-NH_2$), présents à la position C-2 de l'unité répétitive de glucosamine, sont protonnés ($-NH$) voir (figure 2.3). Ainsi, à un pH acide, le chitosane devient soluble, présentant une densité de charge positive qui est en fonction du DDA. L'augmentation du DDA du chitosane augmente la viscosité d'une solution de chitosane à cause de l'augmentation du nombre des groupes libres d'amine. La viscosité d'une solution de chitosane est aussi affectée par d'autres facteurs comme la concentration et la température: la viscosité augmente avec l'augmentation de la concentration et la diminution de la température de chitosane se dissout uniquement en milieu acide par protonation des groupes amine présents sur la macromolécule. L'équilibre suivant décrit l'état d'ionisation du polyélectrolyte en solution acide :



Le pKa du chitosane est approximativement 6,3. Ainsi, lorsque le DDA est peu élevé c'est-à-dire lorsque les groupements amine sont en petite quantité, le chitosane est peu soluble. En général, on utilise du chitosane avec un DDA supérieur à 70 % pour avoir une grande partie soluble.

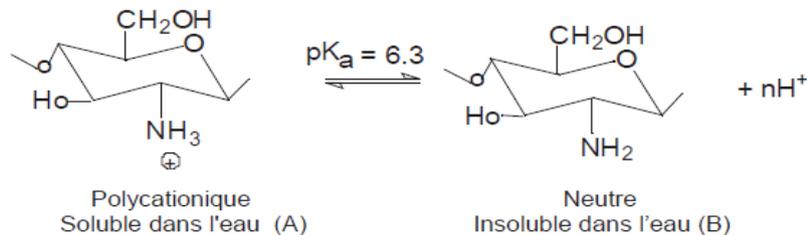


Figure 2.3 : Structures du chitosane en milieu acide (A) et en milieu neutre (B).

2.6. Propriétés de biocompatibilité du chitosane :

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

- **Biodégradabilité :**

La biodégradation du chitosane est assurée par des enzymes qui l'hydrolysent en oligomères. Chez l'Homme et les mammifères, ce rôle est assumé principalement par des lysozymes [18] qui dégradent les liaisons (1-4) glycosidiques des unités N-acétylglucosamine en des résidus N-acétylglucosamine et D-glucosamine, métabolisés ensuite dans l'organisme. Un chitosane de DDA 50 % est ainsi facilement dégradé in vivo dans le sang et les tissus, sans accumulation dans le corps [18].

La dégradation dépend de l'origine et des propriétés du polysaccharide (DDA, masse molaire...) [19]. Une étude plus approfondie a montré d'abord une augmentation de la susceptibilité enzymatique pour les DDA inférieure à 50 %, puis une augmentation

avec le DDA, et finalement une absence de dégradation pour un chitosane de DDA 97 % [20]. Cette influence du DDA est également constatée, *in vitro* (Dégradation par des lysozymes) et *in vivo* (implantation sous cutanée) [21], Un chitosane de DDA 50 % semble donc permettre une dégradation optimale.

• **Cytocompatibilité :**

La cytocompatibilité du chitosane vis-à-vis des fibroblastes, des kératinocytes, des chondrocytes et des ostéoblastes a été démontrée *in vitro*. Lors de cultures cellulaires sur un film de chitosane, la croissance des cellules dépend des caractéristiques et de la source du chitosane. Des travaux montrent que, quel que soit le DA (2-50 %), la mise en contact prolongée de films de chitosane avec les fibroblastes et les kératinocytes n'induit ni la destruction, ni la croissance anarchique de celles-ci, et qu'aucune substance cytotoxique n'est relarguée dans le milieu [22]. Le même comportement est constaté dans le cas de cultures de chondrocytes et de kératinocytes sur un film de chitosane de DA 2,5 % [23] et de culture de chondrocytes et d'ostéoblastes sur une surface similaire de DA 10 % [24].

2.7. Propriétés biologiques :

Le chitosane présente l'avantage de réunir des propriétés très intéressantes. En effet, il inhibe la croissance de nombreux parasites et il réduit le développement des infections : c'est un bon agent antibactérien et antifongique [25]. De plus, le chitosane a des propriétés antitumorales, antivirales, ainsi que des propriétés cicatrisantes remarquables [26]. Il augmente la vitesse de cicatrisation des plaies ouvertes et la reconstruction des tissus tout en prévenant les infections microbiennes. Enfin, le chitosane non seulement stimule la croissance cellulaire, mais il peut également être utilisé comme substrat pour la culture cellulaire (les cellules adhèrent au matériau et le colonisent) [27].

2.7.1 Propriétés antibactériennes :

Le mécanisme d'action du chitosane contre les bactéries est jusqu'à aujourd'hui mal connu. Cependant, il existe plusieurs éléments qui peuvent expliquer cette action, ces éléments sont regroupés dans le tableau 2.1

Tableau 2.1: Les hypothèses d'action antibactérienne de chitosane.

Action	Référence
La formation des liaisons électrostatiques entre les charges positives du chitosane et les phospholipides de la membrane cellulaire qui ont une charge négative, perturbant ainsi les échanges entre la cellule microbienne et le milieu extérieur.	[28-30]
La présence du chitosane peut aussi entraîner des déformations morphologiques au niveau de la paroi cellulaire.	[31-33].
L'inhibition peut aussi être due à l'enrobage des cellules microbiennes par le chitosane, éliminant ainsi tout échange avec le milieu extérieur	[27].
L'action du chitosane peut aussi se faire par formation de liaison avec les protéines et les électrolytes présents dans le cytoplasme	[32-34].
Formation des liaisons entre le chitosane et l'ADN des bactéries et l'inhibition de la synthèse des ARN messager	[28,29]
Le chitosane peut aussi agir de façon indirecte sur les bactéries et les moisissures, et cela par complexation des métaux nécessaires pour leur croissance	[33]

En générale, l'action du chitosane sur les bactéries à Gram négatif est moins importante que celle sur les bactéries à Gram positif. Ce résultat est probablement dû à des différences dans la structure de l'enveloppe cellulaire [35-36]. La paroi cellulaire des bactéries Gram-négatif est constituée d'une fine couche de peptidoglycane et d'une membrane externe composée de lipopolysaccharides, de lipoprotéines et de Phospholipides. Cependant, la paroi cellulaire des bactéries Gram-positif est seulement composée d'une épaisse couche de peptidoglycane sans membrane externe. En raison de cette structure, la membrane externe fonctionne comme une barrière imperméable contre les macromolécules et les substances hydrophobes. Elle pourrait être responsable de la prévention de la pénétration du chitosane dans la cellule, expliquant ainsi l'activité antibactérienne plus faible sur les bactéries Gram-négatif que sur les bactéries Gram-positif [37].

2.7.2. Propriétés antifongiques :

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

- Le chitosane peut interagir avec la membrane des cellules pour altérer leur perméabilité. Par exemple, la fermentation avec la levure boulangère est inhibée par certains cations, qui agissent sur la surface des cellules de la levure en empêchant l'entrée du glucose [38].
- Le chitosane agit aussi comme un agent chélatant qui forme des complexes avec les traces de métaux et inhibant ainsi la croissance des champignons et la production des toxines [39]. Il assure aussi certains processus de la défense à l'extérieur de la cellule par exemple, il agit comme un agent absorbant d'eau et inhibe l'activité des différents enzymes [40]. Il est trouvé que l'utilisation du chitosane à partir d'une concentration de 1 g/L réduit considérablement la croissance des souches fongiques suivante : *Cylindrocladium floridanum*, *Cylindrocarpon destructans* et *Fusarium oxysporum*.

2.7.3. Propriété cicatrisante du chitosane :

L'activité cicatrisante de chitosane est avérée dans la réparation tissulaire de l'épiderme [41] et la cicatrisation [24]. De ce fait, le chitosan est utilisé pour fabriquer des pansements et des bandages [42]. Par exemple, un mélange de chitosan et oxychitine est commercialisé comme agent de recouvrement pour les greffes, le HemCon® Bandage.

Dans le mécanisme d'action cicatrisante du chitosane, **Okamoto et coll.** [43] ont montré que le chitosane agit sur toutes les étapes de cicatrisations. Son premier rôle est de favoriser l'hémostase, le chitosane stimule ensuite la prolifération des fibroblastes et influe le comportement migratoire des neutrophiles et des macrophages, ce qui a pour conséquences de modifier les processus de reconstruction que sont la fibroplasie et la réépithélialisation [43,44].

Ueno et coll. [45] ont étudié aussi l'influence de non-tissés de chitosane sur la cicatrisation des plaies chirurgicales chez les chiens. Là encore, il a été mis en évidence que le chitosane favorise, dès le troisième jour, l'infiltration des macrophages et des cellules inflammatoires, et plus particulièrement

polymorphonucléaires. Cette étude a également montré que le chitosane favorise l'étape de granulation entre le 9^{ème} et le 15^{ème} jour en outre la quantité de collagène dans les tissus reformés est significativement plus importante pour les plaies soignées avec du chitosane.

2.7.4. Propriétés antivirales :

Le chitosane peut inhiber les infections virales dans différents systèmes biologiques. Il est également capable d'induire une résistance à certaines infections virales chez les cellules végétales et animales. De plus, il permet de prévenir le développement de l'infection par des bactériophages dans des cultures microbiennes infectées [46]. Cette activité dépend du degré de polymérisation, le degré de N-désacétylation, la valeur de charge positive, et le caractère des modifications chimiques de la molécule [47].

Le mécanisme de cette activité est mal compris. En générale, le chitosane peut inhiber la réplication des bactériophages par plusieurs mécanismes : diminuer la viabilité des cultures de cellules bactériennes, neutraliser le pouvoir infectieux de particules de phage matures dans l'inoculum et / ou des particules de phage fille, et bloquer la réplication du phage virulent [48].

2.7.5. Propriétés antitumorales :

L'activité antitumorale du chitosane est issue de sa structure chimique qui contient deux groupements actifs (groupements amine au niveau du C₂ et groupements hydroxyles au niveau du C₃ et du C₆). En fait, les interactions entre les charges positives du chitosane (NH₃⁺) 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 [49]. Pour l'activité antitumorale, le chitosane doit être soluble dans l'eau au pH physiologique avec des groupements amines protonés. [50].

L'activité antitumorale du chitosane augmente avec la diminution du poids moléculaire, du degré désacétylation, de la viscosité et donc avec l'augmentation de la solubilité dans l'eau [51, 52]. De plus, les oligomères de chitosane ont également un effet antitumoral en empêchant la croissance des cellules tumorales par stimulation du système immunitaire [53].

2.7.6. Propriétés anti oxydantes :

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 [52].

Les degrés de polymérisation et de désacétylation (DDA) 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 [54]. Par exemple, un poids moléculaire allant de 1 à 3 kDa et un degré de désacétylation de 90 % ont été corrélés avec une haute capacité antioxydante [55].

2.8. Effet du chitosane dans une formulation :

2.8.1. Effet gélifiant :

Les gels de chitosane non réticulés sont considérés comme des gels physiques thermoréversibles. Dans les gels physiques, les interactions macromoléculaires résultent d'interactions ioniques, de van der Waals ou de liaisons hydrogène. La gélification du chitosane dépend de l'équilibre entre les interactions hydrophobes et hydrophiles; les premières dépendent principalement du DDA et les secondes du degré de protonation. Il a été observée, par étude de réacétylation, que la solubilité du chitosane diminue progressivement avec l'augmentation de l'acétylation et résulte finalement en la formation de gels non réversibles. Ils ont démontré que la gélification commence quand le DDA se situe entre 25 et 50% [49]. Ainsi la vitesse de gélification du chitosane augmente avec le DDA. Ont observé une augmentation de la vitesse de gélification avec le poids moléculaire du chitosane.

2.8.2. Effet viscosifiant:

Le chitosane est utilisé dans les compléments alimentaires, nutritionnels et cosmétiques, produits biomédicaux y compris produits de la cicatrisation des plaies. Le chitosane est disponible dans un large éventail de qualités différentes caractéristiques et propriétés, comme la viscosité, le poids moléculaire et le degré de désacétylation. Ce polysaccharide est un excellent améliorant de viscosité et stabilisateur dans les environnements acides. Le chitosane est compatible avec des

composés organiques comme les polymères cationiques et non ioniques, contribue à améliorer l'effet de stériliser le savon. En outre, il aide à protéger la peau.

2.9. Application du chitosane :

Les applications du chitosane sont variées et les nouvelles études pour en développer nécessitent de se multiplier à cause de ses propriétés physico-chimiques et biologiques [56]. Il est entre autres non fermentable, biocompatible, biodégradable et non-toxique. De plus, son coût de fabrication est élevé. A titre d'exemple, quelques propriétés utilisées dans les différents champs d'application du chitosane sont données dans le Tableau 2.2. [57]

Tableau 2.2 : Les différents champs d'application du chitosane

Champs d'application	Application	Propriété
Pharmacie	Encapsulation du médicament	Matériel absorbable avec possibilité de contrôle de libération de principes actifs (enzyme, médicament)
Clinique	Membrane de dialyse, pansement	Rétention d'eau, d'ions, stimulation de la régénération des tissus
Cosmétique	Crème, shampooing, démêlant	Rétention de l'humidité, anti électrostatique, surfactant
Industrie agro – alimentaire	Restructuration des purées de fruits, de légume ou de viande	Formation de film, épaississant
Traitement des eaux	Agent flocculant de cations	Poly électrolytes; chélation de Métaux

En plus depuis le début des années 80 le chitosane n'a cessé de faire l'objet d'énormes investigations dans le domaine biomédical. Le tableau 2.3 résume les différentes applications et formes utilisées du polymère.

Tableau 2.3 : Application biomédical du chitosane.

Forme physique	Applications
Solution	Agent bactériostatique, Agent homéostatique, Cosmétiques
Gel	Système de relargage, Spermicide
Membrane /film	Membrane de dialyse, Lentilles de contact, Réparation tissulaire
Eponge	Hémostatique des muqueuses, Réparation tissulaire
Miscelles	Agents gastriques, Anticoagulants.

2.10. Alginate de sodium :

Les alginates (voir figure 2.4) sont des sels d'acide alginique, constitués de deux monomères saccharidiques de base : acide α - L - guluronique (G) et acide β - D - mannuronique (M), dont la séquence varie.

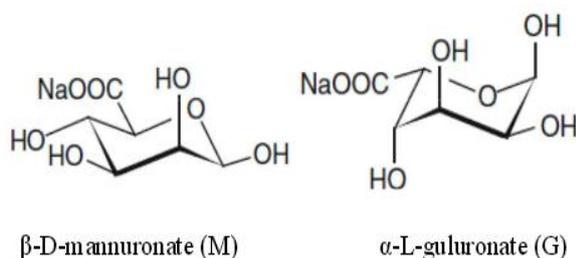


Figure 2.4: Monomère de la chaîne alginate de sodium.

La séquence des différents blocs (M) et (G) (voir Figure 2.5) dépend du type d'algue, de son âge ainsi que de la partie dont est isolé l'alginate. La saison de récolte affecte de même la composition en blocs et les séquences [29] .

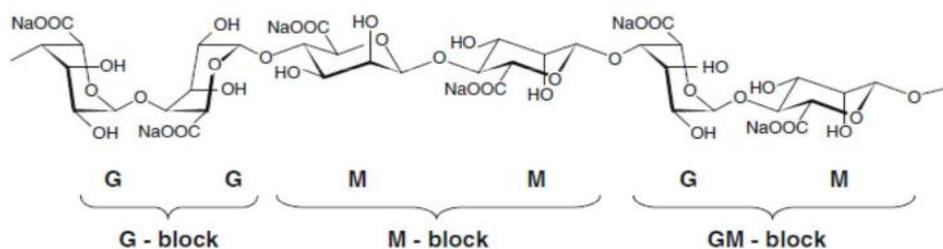


Figure2.5 : Structure chimique de la chaîne d'alginate de sodium

Les alginates de sodium se dissolvent dans l'eau en formant des solutions colloïdales visqueuses à comportement pseudo élastique et ce pour de faibles concentrations. L'addition progressive de cations de chitosane divalents provoque la formation d'un gel.

La complexation entre les deux polymères semble se produire par interaction des anions carboxyliques de l'alginate et les groupements anioniques du chitosane (voir Figure 2.6).

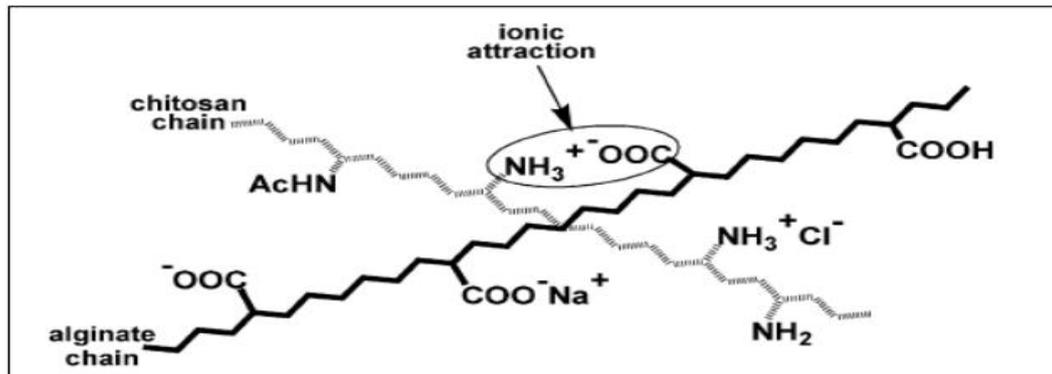


Figure 2.6 : Les interaction ionique entre le groupe anionique ($-\text{COO}^-$) d'alginate de sodium et le groupe cationique ($-\text{NH}_3^+$) de chitosane.

2.11. Propriétés physico-chimique d'alginate de sodium:

- **Solubilité :**

Il existe trois paramètres déterminants limitant la solubilité de l'alginate dans l'eau. Premièrement, Le pH de la solution joue un rôle dans la solubilisation des alginates. Si le pH de la solution contenant l'alginate est inférieure au pKa de l'acide mannuronique (pKa=3,38) ou de l'acide guluronique (pKa= 3,65), alors il peut y avoir séparation de phases voire formation d'un hydrogel. La sensibilité des alginates vis-à-vis du pH de la solution dépend non seulement de la masse molaire mais aussi de la composition chimique et de la séquence des blocs. Les alginates contenant plus de sections alternées (blocs MG) précipiteront à des valeurs de pH plus faibles que les alginates contenant plus de blocs homogènes (poly-M et poly-G). Deuxièmement, la force ionique du solvant joue un rôle important sur la solubilité de l'alginate en limitant son hydratation en milieu aqueux. Et pour finir, le taux de cations gélifiants présents dans le solvant influence bien évidemment la solubilité de l'alginate. [59].

- **Gélification :**

Les propriétés physiques de l'alginate sont décrites pour la première fois dans les années 1970. La principale caractéristique de l'alginate est sa capacité à gélifier en

présence de cations multivalents. Cette transition sol/gel n'est pas influencée par la température.

Les sels d'alginate sont solubles dans l'eau et sont capables de gélifier en présence de cations multivalents tels que les ions Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} ou encore Al^{3+} grâce à la formation d'une jonction impliquant plusieurs chaînes polysaccharidiques.

Cette interaction est décrite par le modèle « egg-box » dans lequel chaque ion divalent peut interagir avec deux résidus G adjacents ou appartenant à deux chaînes opposées.

- **Comportement rhéologique :**

Les alginate ont en général un comportement quasi-Newtonien, même si des déviations peuvent être observées suivant plusieurs facteurs, notamment le type d'alginate, la concentration de la solution, la composition chimique de l'alginate, sa masse moléculaire moyenne ...etc. Pour des solutions d'alginate de sodium de différentes concentrations. On constate une dépendance linéaire dans tous les cas, traduisant un comportement Newtonien, excepte pour la concentration la plus élevée, pour laquelle on peut observer une légère déviation.

2.12. Application de l'alginate de sodium :

L'alginate produit à grande échelle trouve des applications principalement dans les domaines de l'agroalimentaire et textile, pour laquelle environ 80% de la production y est transformée.

Ses propriétés colloïdales uniques font qu'il peut être utilisé en tant qu'épaississant, stabilisant, agent filmogène, gélifiant.....etc. tableau 2;4 [60].

Tableau 2.4.Répartition de l'alginate de sodium pour les différents secteurs industriels et exemples d'applications.

Application	Rôle de l'alginate de sodium
Industrie technique (50%)	Epaississant pour les pâtes d'impression, Epaississant et stabilisateur des teintures, Agent d'imperméabilisation, Agent plastifiant et filmogène.
Industrie agroalimentaire (30%)	Epaississant, texturant, conservateur, dans de nombreux produits : confitures, jus de fruits, sauces (moutarde, mayonnaise), potages, produits laitiers, stabilisateur dans les crèmes glacées (empêche la formation de cristaux).
Industrie du papier (5%)	Agglomérant pour les fibres, apprêt de surface, Epaississant et stabilisant dans les colles, Maintien des pigments en suspension
Industrie pharmaceutique (5%)	Stabilisateur d'émulsions, agglomérant dans les comprimés, épaississant et hémostatique dans les pommades, pansements, mèches nasales, Gélifiant dans les pâtes à empreinte dentaire.
Divers (10%)	Epaississant dans les produits de beauté et pâtes à dentifrice, stabilisateur pour les peintures et vernis, Flocculant en traitement des eaux, Agglomérant pour les électrodes de soudure, Agent absorbant dans les couches pour bébé.

CHAPITRE 03

PARTIE

EXPERIMENTALE

Introduction

Dans ce chapitre, nous décrirons en premier lieu, les différentes étapes de l'extraction du chitosane ainsi que la caractérisation quantitative de notre biopolymère. En second lieu, nous décrirons le procédé de formulation adopté et les matières premières utilisées au cours de la préparation des suspensions ainsi que les différentes méthodes de caractérisation et de contrôle réalisés sur les suspensions formulées. Et enfin, nous décrirons les études préliminaires effectuées et la méthodologie expérimentale employée.

3.1. Matériels et méthodes

3.1.1. Produits utilisés pour l'obtention du chitosane :

Le chitosane a été extrait à partir de la carapace crevette. Cette dernière est de classe des crustacés, famille aristeidae et du genre : *Aristeus antennatus* et *aristaeomorpha foliacea*, nommée la crevette rouge.

Les produits chimiques utilisés lors de l'extraction du chitosane sont regroupés sur le tableau 3.1

Tableau 3.1 : Les produits chimiques utilisés lors de l'extraction du chitosane

Produits utilisés	Rôle
Solution de l'acide chlorhydrique (HCl)	Déminéralisation de chitine.
Solution de la soude (NaOH)	Desacylation et Déprotéinisation de la chitine.
Acide acétique	Solubilisation du chitosane
L'eau oxygène H ₂ O ₂	Blanchiment du chitosane
Acétone	Blanchiment (impuretés)

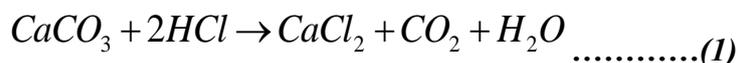
3.1.2. Extraction de la chitine :

La matière première utilisée pour cette étude est l'exosquelette de crevettes rouge (mélange d'*Aristeus antennatus* et d'*Aristaeomorpha foliacea*), qui nous ont été fournies fraîches. Elles sont décortiquées à température ambiante, les carapaces sont ensuite lavées puis séchées à l'air libre. Les fragments obtenus sont séchés à 100°C pendant 24h puis broyés et triés sur tamis afin de séparer plusieurs tailles.

La teneur en eau des fragments obtenue après séchage est estimée à 78%. Le broyage et le tamisage des fragments ont donné des particules d'un diamètre variant majoritairement entre 0,1 mm et 0,5 mm, seule cette fraction fut utilisée pour réaliser les différents essais de déminéralisation, puisqu'étant la fraction majoritaire. L'extraction chimique consiste en une déminéralisation acide et une déprotéinisation basique.

A. Déminéralisation :

La déminéralisation s'effectue en dispersant la matière première obtenue dans une solution d'acide chlorhydrique 5M (1 :10) (m: v) sous agitation constante pendant 1h à température ambiante. La réaction produit un violent dégagement de gaz carbonique qui doit être maîtrisé en ajoutant graduellement la matière première l'ensemble du système doit être ouvert. Théoriquement la réaction (1) se termine lorsqu'il n'y a plus de dégagement gazeux. Le contenu est ensuite filtré sur papier filtre et rincé abondamment à l'eau distillée.



B. Déprotéinisation :

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

C. Blanchiment :

Lorsque l'eau de rinçage n'est plus colorée, l'eau distillée est remplacée par un volume de 20 ml de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pour blanchir le produit, Un ultime rinçage à l'acétone permet d'entraîner les impuretés lipidiques résiduelles. Le contenu du flacon est à nouveau rincé abondamment à l'eau distillée et ce jusqu'à ce que le pH de l'eau du lavage atteigne la neutralité, le filtrat est alors transféré dans une coupelle préalablement pesée qui sera par la suite placée en étuve à 30°C pendant 20 heures et en suite à 90°C pendant 12 heures.

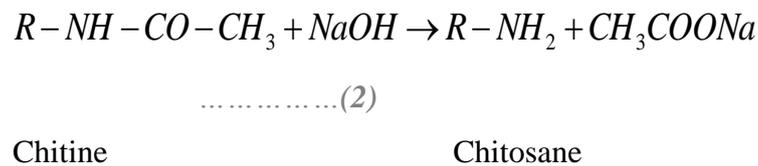
Le nouveau poids de la coupelle contenant le produit sec permet de déduire le rendement massique d'après la formule suivante :

$$\left\{ \begin{array}{l} Rm : \text{Le rendement massique (\%)} \\ m_f : \text{La masse finale (g)} \\ m_i : \text{La masse initiale (g)} \end{array} \right. \quad Rm\% = \frac{m_f(g)}{m_i(g)} \cdot 100$$

3.1.3. Préparation du chitosane :

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

La chitine a été traitée avec une solution de soude à 50%, dont la proportion (m/v) (1/10), la solution est agitée pendant 24 heures à 100°C. Au terme de la réaction, la solution est filtrée, le chitosane retenu est lavé en Continu, afin d'éliminer la soude résiduelle selon la réaction (2), et ce jusqu'à ce que le pH de l'eau du lavage atteigne la neutralité, le chitosane est rincé avec l'eau distillée puis sécher à l'étuve à 80°C.



3.1.4. Caractérisation physico-chimique du chitosane :

1. Teneur en eau :

Pour estimer la part d'eau dans le produit, 1 à 2 g d'échantillon sont prélevés et pesés dans une coupelle de poids connu, la coupelle est placée 24 h dans une étuve à 105°C.

Puis pesée après 30 min de refroidissement, l'expérience est réalisée en triplicata.

La teneur en eau est évaluée selon la formule suivante :

$$\% \text{ Humidité} = \frac{\text{Poids humide (g)} - \text{Poids de l'échantillon sec (g)}}{\text{Poids de l'échantillon humide (g)}} \cdot 100$$

2. Teneur en cendres :

Le principe de la détermination de la teneur en minéraux repose sur leur résistance à la chaleur, Environ 1 g d'échantillon est pesé et placée au moins 5 heures à température égale 500°C.

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

La teneur en cendres est évaluée selon la formule suivante :

$$\% \text{ Cendre} = \frac{\text{Poids du résidu calciné (g)}}{\text{Poids de l'échantillon sec (g)}} * 100$$

3. Teneur en lipides :

La teneur en lipides totales est déterminée par la méthode de Folchen Duplicata. Environ 5 g d'échantillon est ajoutés à 100 ml d'une solution de chloroforme/méthanol (2/1).

L'ensemble est introduit dans un erlenmayer à 1/20 (substrat solide/volume en ml) laissé sous agitation pendant une nuit à température de la pièce, filtré sur papier filtre et lavé, puis avec le mélange (chloroforme/méthanol), le filtrat est mélangé à 22 ml d'une solution contenant 0,9 % (m/v) de NaCl dans une ampoule à décanter et laissé reposer jusqu'à l'obtention d'un système biphasique net (durant du moins 6 heures). L'ampoule a été dégazée plusieurs fois, la phase organique est prélevée, filtrée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée sous vide à 35°C.

L'huile recueillie est pesée sur une balance et la teneur en lipides est déterminée avec la formule suivante :

$$\% \text{ Lipides} = \frac{\text{Poids des lipides (g)}}{\text{Poids de l'échantillon (g)}} * 100$$

4. Test de solubilité :

Le chitosane commerciale et extrait utilisés sont testés pour leur solubilité dans les milieux acides, basique, neutre.

Selon Ngah et Fatinthanle teste de solubilité a été réalisé dans 5% (v / v) de l'acide acétique, 0.5M de NaOH et de l'eau distillée.

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

5. Mesure du degré d'acétylation :

Le degré d'acétylation (DDA) de la chitine correspond à la fraction molaire moyenne des unités de N acétyl D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités, de nombreuses méthodes ont été développées pour déterminer ce DDA.

- **Par titrage potentiométrique :**

La détermination potentiométrique du degré d'acétylation était suivant un titrage acido-basique comme décrit par Tolimate, avec pH mètre muni d'un électrode sensible.

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

Titrer avec la solution NaOH (0.1M) tout en introduisant la sonde du pH mètre dans la solution.

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

$$\text{DDA}\% = 2,03 * \frac{V_2 - V_1}{m + 0,0042 (V_2 - V_1)}$$

Avec :

m : masse du chitosane (g).

V₁ et V₂ : volume de NaOH ajouté correspondants aux deux points d'inflexion (ml).

2.03 : Coefficients résultats du poids moléculaire de l'unité de monomère de chitosane.

0.0042 : Coefficient résultats de la différence entre le poids moléculaire du monomère acétylé et la masse moléculaire désacétylé.

3.1.5. Préparation de la suspension:

Dans cette partie, nous allons aborder les différentes techniques de mise en œuvre de la suspension.

3.1.6. Description de matières premières utilisées:

➤ Les excipients

Le principe adapté afin de mettre en œuvre une suspension à libération prolongée est celui de la gélification in situ. Ce mécanisme est basé sur la complexation d'un polysaccharide, et de choisir un pH adéquat permettant de maintenir en suspension le chitosane ainsi que le principe actif.

Sur le tableau 3.2 nous allons présenter les matières premières utilisées lors de la formulation des suspensions.

Tableau 3.2: Les matières Premières utilisées.

Constituants	Structure chimique	Aspect	Solubilité	Rôle
Alginate de sodium	$\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$	Poudre blanche inodore	Soluble lentement dans l'eau	Agent stabilisant Agent gélifiant
Chitosane	$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5$	Poudre blanche amorphe	Insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques Soluble dans le milieu acide	Agent de conservation Stabilisateur Antimicrobien Immunostimulant Anti tumoraux Anticoagulants Bactériostatique Libération contrôlées

➤ Principe actif

Le principe actif utilisé lors de la formulation de la suspension est la Ranitidine, ce PA est un antihistaminique H_2 qui inhibe la production d'acide gastrique. Il est couramment utilisée pour le traitement de l'ulcère gastroduodénal et du reflux

gastro-œsophagien. La structure de la Ranitidine est présentée sur la figure 3.1, de nomenclature N-(2-[(5-[(diméthylamino) méthyl] furan-2-yl) méthylthio] éthyl)-N'-méthyl-2-nitroéthène-1,1-diamine, sa formule brute est $C_{13}H_{22}N_4O_2S$ et Masse molaire : 350,869 g/mol [72] .



Figure 3.1: structure de Ranitidine.

3.1.7. Pré-formulation :

D'après l'étude bibliographique effectuée sur le mécanisme de gélification in situ et sur la libération prolongée du PA, on a pu constater que l'ingrédient qui a un impact principal sur le taux de libération du PA dans des suspensions est bien le chitosane[63]. Aussi, la réalisation d'une étude d'influence de sa concentration sur les propriétés rhéologiques et biopharmaceutiques des suspensions à libération prolongée semble intéressante pour pouvoir cerner l'intervalle de variation de la concentration de cet ingrédient qui peut procurer des propriétés intéressantes aux suspensions formulées avant d'entamer l'étude d'optimisation des paramètres de formulation. Au cours de cette étude la concentration du chitosane a été variée entre 0,5% à 2%.

Les conditions opératoires et le cheminement suivi lors de la réalisation de ces essais ont été pris comme suit :

- **Composition des essais :**

La composition qualitative et quantitative des essais réalisés au cours de cette partie sont présentés sur le tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Les formules qualitative et quantitative utilisés lors des essais de Pré-formulation.

la matière première	Quantité (g/ml)	Observation
Ranitidine	1 g/100ml	Selon le dosage de la spécialité de référence [64]
Alginate de sodium	Entre 1,5 et 4g /100ml	Trois concentration ont été étudiées 1,5-3-4g/100ml Valeur moyenne de l'intervalle de variation selon le Handbook des excipients[65]
Chitosane	Entre 0,5 et 2g /100ml	Trois concentration ont été étudiées 0,5-2g /100ml
Eau bi-distillé	Qs100ml	[66]

- **Procédés de préparation :**

Au cours de la préparation des suspensions nous avons procédé selon le protocole suivant :

1. Dans un bécher l'Alginate de Sodium est incorporé progressivement dans l'eau, sous agitation avec une vitesse adéquate pour former un vortex, l'agitation est maintenue jusqu'à l'obtention d'une dispersion totale, auquel aspect de l'alginate en solution passe de l'état crémeux à l'état mielleux ;
2. Le Chitosane est ensuite ajouté graduellement pour éviter la formation des grumeaux ;
3. En derniers lieu le principe actif 'Ranitidine ` est rajouté à la préparation sous agitation ;
4. Finalement, la quantité 100 ml est obtenue par rajout d'eau bi-distillé ;
5. Le pH des suspensions préparés est mesuré à l'aide d'un pH mètre **type** ;
6. La densité des suspensions préparées a été mesurée à l'aide de densimètre.

3.1.8. Formulation :

Lors de notre étude, nous avons eu recours à une planification expérimentale des essais en utilisant la méthode des plans d'expérience, qui peut répondre à nos préoccupations[67], ce dernier permet de :

- Minimiser les essais qui permettent d'avoir du gain de temps et de coût ;
- Arriver rapidement aux meilleurs résultats possibles;
- Interprétation des résultats expérimentaux ;
- Eviter de réaliser les expériences inutile ;
- Découvrir la solution optimale.

❖ Méthode des Plans d'expériences :

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles[69]. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt Y et des variables X_i . Il faut penser aux plans d'expériences si l'on s'intéresse à une fonction du type :

$$Y=f(X_i)$$

Avec les plans d'expériences on obtient le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Pour cela, il faut suivre des règles mathématiques et adopter une démarche rigoureuse [70]. Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur. Les principes fondamentaux de cette science seront indiqués et les principaux plans seront passés en revue.

La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle d'espace expérimental et celle de modélisation mathématique des grandeurs étudiées.

- Terminologie :

La méthode des plans d'expériences utilise une terminologie bien adaptée dont les éléments les plus courants sont[70].

a) Les facteurs :

Les facteurs, parfois appelés Variables Indépendantes, sont les causes supposées ou certaines, qui provoquent le phénomène. Un facteur peut être qualitatif ou quantitatif, continu ou discontinu, contrôlable ou non contrôlable.

b) Les réponses :

Une réponse expérimentale, parfois appelée variable dépendante, est une caractéristique mesurable d'un produit ou d'un processus, et dont la variation est analysée en fonction des variations des facteurs. La réponse doit être la plus représentative possible du phénomène observé. Le choix des réponses est un problème difficile qui ne relève pas directement de la théorie des plans d'expériences. Ce n'est qu'après une analyse minutieuse des phénomènes, des enjeux des objectifs et des contraintes que là où les bonnes réponses peuvent être définies.

c) Les interactions :

Lorsque l'effet d'un facteur dépend de la valeur prise par un autre facteur, cela se traduit par une interaction entre les deux facteurs.

d) Plan d'expérience :

Le plan d'expériences est la liste des combinaisons des niveaux des facteurs pour lesquels la réponse Y du modèle doit être observée.

Il se représente sous la forme d'un tableau dans lequel chaque colonne identifie les niveaux d'un facteur, exprimés en coordonnées centrées réduites dans la matrice de conception et en coordonnées réelles dans le plan d'expérience, chaque ligne identifie une combinaison des niveaux des facteurs.

Dans notre cas le but de notre étude est d'optimiser la formulation d'une suspension médicamenteuse à libération prolongée et d'étudier l'effet de variation des concentrations des paramètres de formulation sur les caractéristiques rhéologiques et biopharmaceutiques de ces suspensions par le mécanisme de gélification in-situ.

Les caractéristiques prises en compte sont les propriétés rhéologiques ainsi que les

Propriétés biopharmaceutiques des suspensions. Ces réponses ainsi que les moyens de leurs mesures sont résumés dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Caractérisation du produit selon les réponse et moyens de mesure

	Caractérisation du produit	Réponse	Moyens de mesure
01	Analyse rhéologique	Détermination de la courbe d'écoulement (Paramètre de modélisation et rhéologique)	Rhéomètres MCR 302

a) Recensement et caractérisation des facteurs :

Deux paramètres de formulation ont été sélectionnés parmi un grand nombre de facteurs ceux qui ont plus d'influence sur les réponses, pour être étudié dans cette partie :

- Concentration de l'alginate de sodium ;
- Concentration du chitosane ;
- Le pH d'eau distillée ;
- Les autres facteurs PA sont maintenue constants.

b) Choix du domaine expérimental :

Pour cela on définit les facteurs et leur intervalle de variation exprimés en pourcentage (g/100 ml) dans la formule centésimale du produit décrit dans le tableau3.5.

Tableau 3.5 : Facteurs retenus et intervalles de variation.

	Facteurs	Abréviation	Intervalle de variation en (g/100ml)
1	Concentration de l'alginate de sodium	Alg	3-8
2	Concentration du chitosane	Chi	0,5 -2
3	Eau	H ₂ O	Jusqu'à 100ml

c) Détermination du type de modèle et de plan/ matrice d'expériences :

Compte tenu de l'objectif visé par cette étude et sachant que les facteurs retenus ont une influence certaine dans le domaine expérimental, la stratégie de planification expérimentale la plus adéquate est l'étude en surface de réponse appelée stratégie «P» .

Le nombre des facteurs de la formulation étant égal a trois [03], le modèle mathématique quadratique avec interaction proposé, s'écrit comme suit :

$$Y=a_0+ a_1X_1+ a_2X_2+ a_3X_3+ a_{12}X_1X_2+a_{13}X_1X_3+a_{23}X_2X_3$$

Avec :

Y:la réponse ;

X_1, X_2, X_3 :valeurs centre réduits compris entre -1 et +1 ;

X_1 : la concentration de l'alginate de sodium ;

X_2 : la concentration du chitosane ;

X_3 : le volume de H₂O.

Les méthodes de construction des plans d'expériences sont nombreuses et peuvent être effectuées notamment à l'aide d'un logiciel. Pour notre étude, nous avons utilisés le mode 06. La matrice d'expériences générée est résumée dans le tableau3.6.

Tableau 3.6 : La matrice d'expériences générée.

N° Essais	Quantité en (g/100ml)			Eau (ml)
	alginate de sodium	chitosane	PA	
1	3	0.5	1	95.5
2	3	0.5	1	95.5
3	8	0.5	1	90.5
4	3	2	1	94
5	5	1	1	90
6	7	2	1	90
7	3	1.5	1	94.5
8	6.3	0.5	1	92.1
9	4.3	2	1	92.6
10	7.3	1.6	1	90
11	5.8	1.2	1	92
12	5.8	1.2	1	92
13	5.8	1.2	1	92
14	5.8	1.2	1	92

A partir de la matrice d'expériences, on réalise les 14 essais de formulation. Ces derniers sont réalisés selon la formule et le procédé décrit ci-dessous. Sur chacun des essais, des contrôles en cours et en fin de formulation sont effectués conformément aux exigences pharmaceutiques dont les protocoles opératoires sont décrits.

3.1.9. Caractérisation physico-chimique de la formulation :

- **Détermination du pH**

Il est important de déterminer la valeur de pH pour la conservation et les incompatibilités des suspensions formulées et les solutions du milieu gastrique de HCl diluées à 0,1M.

- **Détermination de la Densité**

La densité relative de chaque suspension a été mesurée à l'aide d'un densimètre à température correspondante à 20°C.

3.1.9.1. Test de gélification in situ:

Ce test consiste à la simulation d'un système in vitro au milieu gastrique afin d'évaluer l'intensité de gélification de chaque suspension préparée .

Le système est constitué d'un bécher de 250 ml dans lequel est met un volume d'une solution d'acide chlorhydrique HCl 0,1 M correspondant à 150 ml. Le bécher en question est thermostaté dans un bain marie à une température de 37°C à l'aide d'une résistante. Une fois la température atteinte, 20 ml de chaque suspension sont introduits au centre du bécher dans ce milieu acide à travers une cuillère pour provoquer la gélification. Cette gélification est identifiée par une observation visuelle et par une analyse rhéologique.



Figure 3.2 : Dispositif expérimental utilisé pour la gélification in-situ.

3.1.9.2. Caractérisation rhéologique :

L'étude rhéologique des suspensions réalisée a été effectuée au niveau du laboratoire de recherche physico-chimique. Le dispositif utilisé est un rhéomètre rotatif à plateaux parallèles (plan-plan) « physiqua MCR 302 », ce dernier est géré par un ordinateur qui permet le traitement des résultats par un logiciel.

Il s'agit d'une étape très importante qui nécessite de bien définir les conditions expérimentales de caractérisation qu'il faut bien évidemment adapter à l'utilisation du fluide[71].

La caractérisation rhéologique des suspensions a pour objectif, d'étudier l'influence de variation des concentrations de paramètres de formulation sur leur comportement rhéologique. Du fait que la résistance à l'écoulement des suspensions est liée à la rigidité du réseau de particules formées au sein du liquide, la rhéologie permet donc une mesure macroscopique de la force nécessaire pour vaincre les résistances à l'écoulement, ainsi d'évaluer la stabilité et la facilité de prise au moment de l'emploi. Alors, tous les éléments obtenus lors de cette étude permet de cerner le domaine de variation, auquel les suspensions présentent un comportement rhéologique intéressant.

Cette caractérisation inclut l'étude du comportement rhéologique des suspensions préparées ainsi que les gels pour permettre d'observer la façon dont ils s'écoulent en réponse à une force appliquée.

La détermination de la courbe d'écoulement permet de faire ressortir des paramètres caractéristiques qui sont susceptibles de refléter l'état mécanique des suspensions et des gels.

Le protocole opératoire adopté est :

- Une rampe croissante en vitesse de cisaillement de $0,1\text{s}^{-1}$ à 1000s^{-1}
- Le temps de mesure entre deux points successifs est 5s.

Les courbes d'écoulements pour les suspensions et gels sont données en termes de contrainte de cisaillement (Pa) en fonction de la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}(\text{s}^{-1})$.

Ainsi que les courbes de viscoélasticité pour les suspensions et les gels qui sont données en termes de G'' en fonction de la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}(\text{s}^{-1})$.

Avec :

G' : C'est le module de conservation et il caractérise la réponse en phase avec la déformation. Il est associé à la réponse du comportement élastique (Pa).

Introduction

Dans cette partie, nous présentons les résultats sur l'extraction du chitosane qui ont été effectués au niveau du laboratoire, puis nous décrivons les résultats de l'étude expérimentale portant sur l'optimisation des paramètres de formulation des suspensions à libération prolongée.

Dans la première partie de ce chapitre, nous présentons les résultats obtenus lors de la caractérisation physico-chimie du chitosane.

Dans la seconde partie, nous présentons les résultats obtenus lors de la réalisation de l'étude préliminaire portant sur l'impact de la concentration d'alginate de sodium et du chitosane sur l'étude de la stabilité des suspensions et leurs propriétés rhéologiques.

3.2. Résultats et discussion

3.2.1. Préparation de la matière première :

Extraction de chitine et production de chitosane.

1. Préparation des carapaces:

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

2. Préparation de chitine :

L'extraction chimique du chitosane a été effectuée en 3 étapes principales ; déminéralisation, déprotéinisation et blanchiment. Le rendement massique après l'extraction de chitine égale 20.02%.

3. Préparation du chitosane « désacétylation » :

Cette étape est réalisée à partir de la désacétylation de la chitine préparée, cette dernière est traitée avec une solution basique (50%). Le chitosane obtenu est de couleur légèrement jaunâtre avec un rendement massique après la désacétylation égale 69.12%.

3.2.2. Caractérisation physicochimique de la carapace brute de crevettes :

Après l'étape de l'extraction, il est important de déterminer les paramètres physico-chimiques du chitosane obtenu.

3.2.2.1. Détermination de teneur en eau, cendres et lipides :

Parmi les analyses physicochimiques du chitosane effectuées, la détermination de la teneur en eau, la teneur en minéraux (cendres) et la teneur en lipides.

Le résultat des trois caractérisations obtenues est regroupé dans le tableau 3.7

Tableau 3.7: Les résultats des caractéristiques de chitosane.

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

Notre carapace est caractérisée par une faible humidité liée à sa structure rigide.

Ces variations constatées dans les taux des cendres peuvent être dues aux différences : de la période saisonnière, de leur habitat de reproduction et de l'environnement extérieur dans lequel le crustacé est exposé ;

Une faible coloration traduite par la présence de 2% de lipides et de pigments.

3.2.2.2. Détermination de la solubilité :

L'intérêt porté à la solubilité du chitosane est justifié par la nécessité de dissoudre la substance dans une phase aqueuse afin d'assurer une multitude d'application.

La solubilité du chitosane commercial et le chitosane extrait au laboratoire est présentée sur le tableau 3.

Tableau 3.8: Test de solubilité du chitosane extrait et du chitosane commercial.

<i>Solutions</i>	<i>Chitosane extrait</i>	<i>Chitosane commerciale</i>
<i>Acide acétique</i>	<i>Soluble</i>	<i>Soluble</i>
<i>Eau</i>	<i>Insoluble</i>	<i>Insoluble</i>
<i>NaOH</i>	<i>Insoluble</i>	<i>Insoluble</i>

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

Nous avons vérifié la solubilité du chitosane à différentes concentration d'acide acétique, le résultat est présenté sur le tableau 3.9.

Tableau 3.9 : Résultats du test de solubilité du chitosane extrait et commerciale à différentes concentrations d'acide acétique.

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

La différence liée à la solubilité des deux types de chitosane est liée au degré de désacétylation, lorsque le DDA est peu élevé, le chitosane est peu soluble, cette différence

nous permet de déduire que le DDA du chitosane extrait est plus élevé que celui chitosane commerciale, ce qui est à démontrer dans la suite de notre travail.

3.2.2.3 Détermination du degré de désacétylation et du pKa par titrage potentiométrique

La détermination du DDA par dosage pH-métrique s'effectue selon la méthode de (Tolaimate et al 1990). Dans cette méthode, le chitosane a été solubilisé dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl) (0.1M) et ensuite dosé par une solution

d'hydroxyde de sodium (NaOH) (0.1M), la mesure de changement de pH permet de tracer la courbe présente à la Figure 3.3. (voir Appendice A)

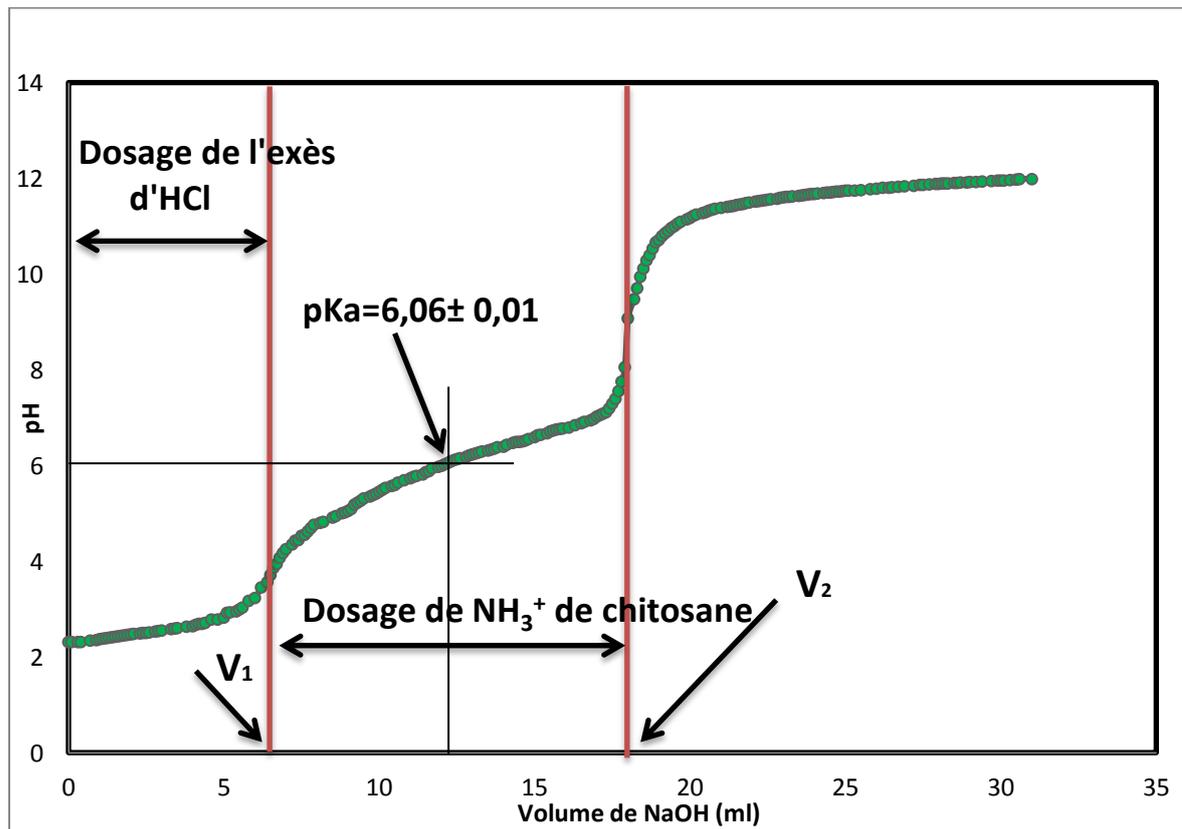


Figure 3.3 : Courbe du dosage pH métrique du chitosane extrait.

La figure 3.3 présente une courbe avec deux points d'inflexions correspond à V_1 et V_2 , la différence de volume de NaOH entre ces deux points lié à la quantité de HCl nécessaire pour protoner les groupements amine (NH_2) du chitosane. Ainsi deux zones sont distingués sur cette courbe, la première zone correspond au dosage l'excès de HCl et la second correspond au dosage des fonctions amine de chitosane ($-\text{NH}_3$) qui se déprotonés au fur et à mesure de l'ajout de titrant (NaOH).

Le calcul du DDA du chitosane se fait selon la formule (3) et de l'ordre de 93,36%. Tandis que le pKa est égale au pH correspond au point de demi neutralisation ou la concentration des groupements ($-\text{NH}_3$) est égale à la concentration des groupements (NH_2) du chitosane, ce qui nous permet de déterminer graphiquement le pKa à partir du premier point d'inflexion (situe entre V_1 et V_2).

Dans notre cas le pKa est égale 6.06 ± 0.01 (Figure 3.3 et Figure 3.4)

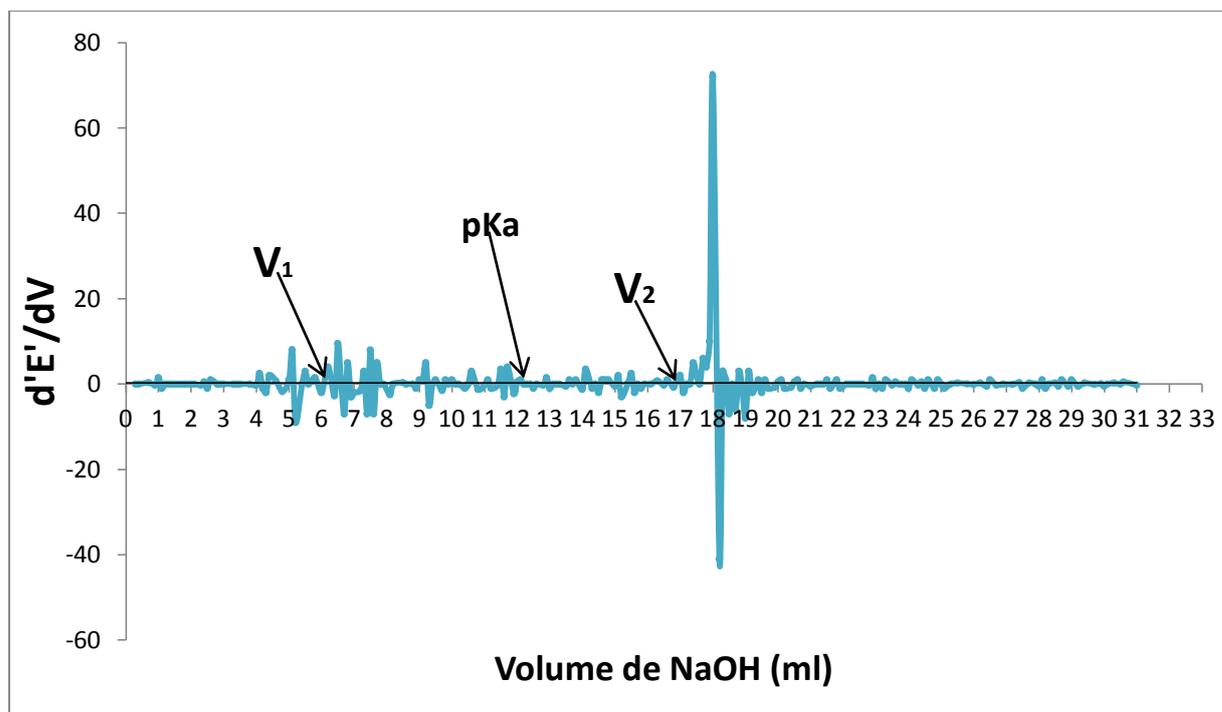


Figure 3.4 : dérivée seconde du dosage potentiométrique du chitosane extrait.

3.2.2.4. Mesure du degré d'acétylation par IR-TF :

Le spectre obtenu par spectroscopie Infra-Rouge pour le chitosane préparée est comparé à celui le chitosane commerciale présente dans la Figure 3.4

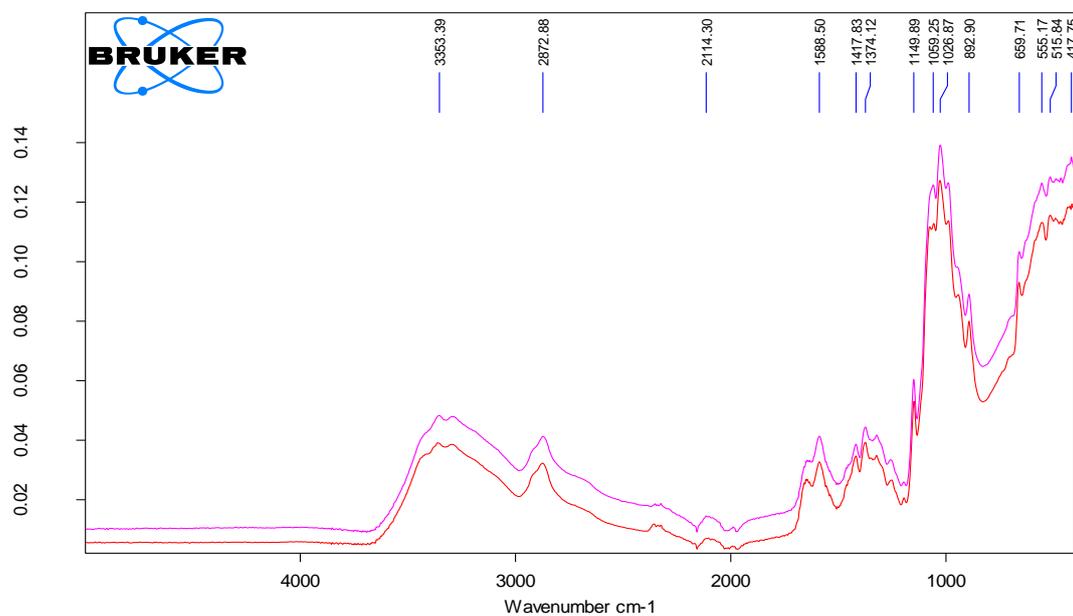


Figure 3.5 : Spectre IR-Rouge d'extrait et commerciale.

La figure 3.5 montre que les intensités des pics entre 3000-3500 caractérisent les liaisons d'hydrogène intermoléculaires $C_2-NH_2 \dots O=C_7$ et C_6-OH , ces derniers sont intenses dans le spectre du chitosane extrait moins que du chitosane commerciale, cette diminution est liée avec l'augmentation du degré de désacétylation.

On voit aussi des pics de l'amine I et de l'amine II correspondant respectivement à 1557 cm^{-1} et 1625 cm^{-1} .

Ainsi que la spectroscopie IR-TF permettrait de déterminer le degré d'acétylation.

3.2.2.5. Caractérisation par diffraction rayon X (DRX) :

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

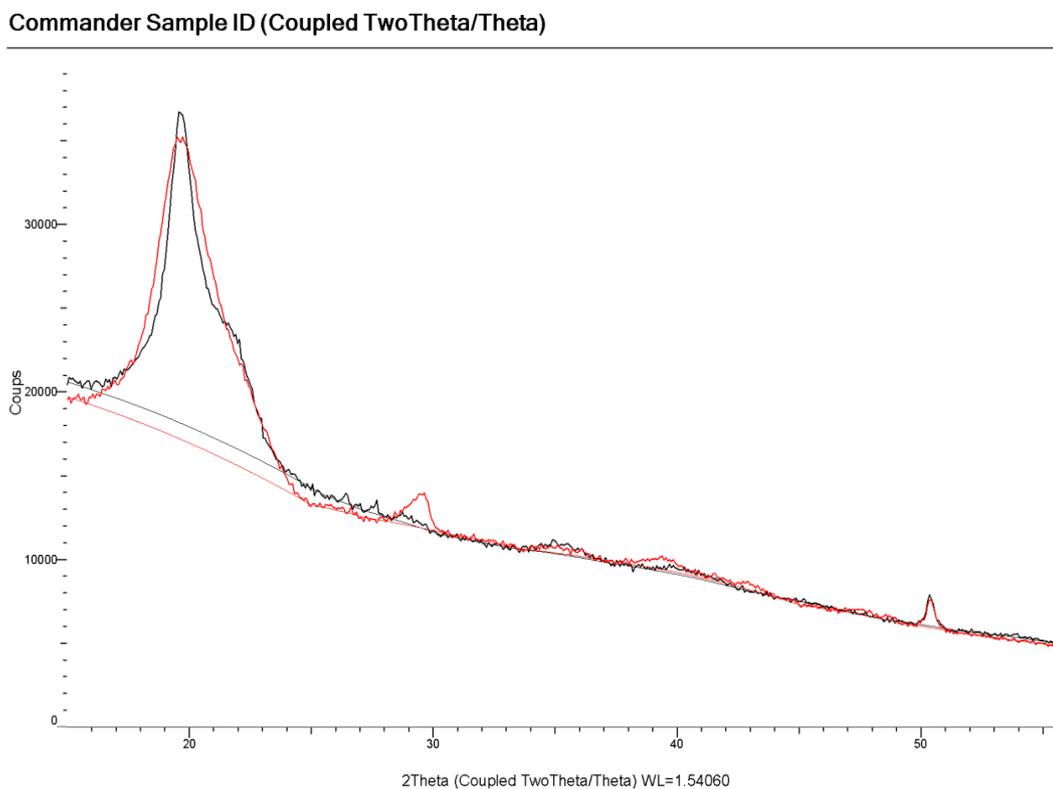


Figure 3.6 : Diffractogramme de chitosane commerciale et extrait.

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

Le chitosane extrait montre un pic intense de réflexion autour de $2\theta = 20^\circ$ dans le rang de $2\theta = 15$ à 40° , ce pic est aussi observé dans le diffractogramme du chitosane

commerciale, mais il est moins intense que ce dernier. En plus est légèrement déplacé vers les angles les plus élevés, ce qui explique la différence entre les valeurs de degré de désacétylation du chitosane commerciale et chitosane extrait.

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

La technique adoptée pour déterminer l'indice de cristallinité consiste à calculer le rapport entre l'aire des pics associés aux zones cristallines sur l'aire totale .

L'indice de cristallinité atteint donc 30.14% pour le chitosane extrait et 27.36% pour le chitosane commerciale.

3.2.2.6 Caractérisation par microscope électronique à balayage :

L'image obtenue par microscope électronique à balayage du chitosane extrait et de la commerciale est présentée dans la Figure 3.7 et la figure 3.8.

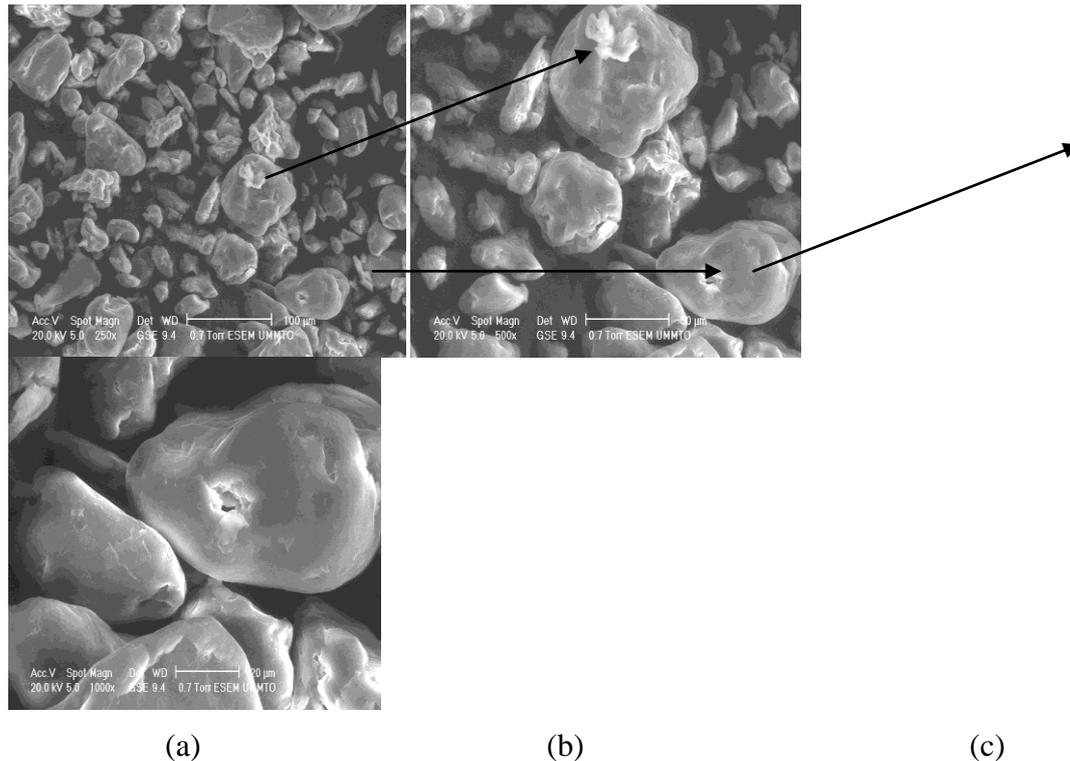


Figure 3.7 : Image par microscope électronique à balayage du chitosane commerciale à différentes dimensions : 100 μm , 50 μm , 20 μm .

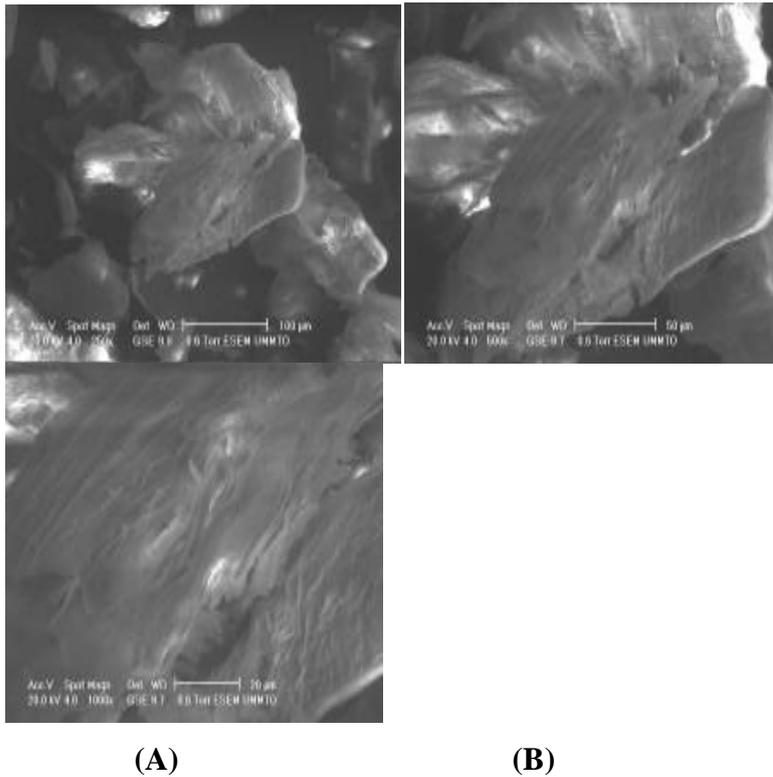


Figure 3.8 : Image par microscope électronique à balayage du chitosane extrait à différentes dimensions : $100 \mu m$, $50 \mu m$, $20 \mu m$.

Quatre points de comparaison principaux ont été observés dans cette analyse:

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

et une surface complètement hétérogène.

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

Cette comparaison peut être confirmée par des analyses complémentaires comme l'étude granulométrique (pour la détermination de la distribution granulométrique exacte et les diamètres moyens) ou encore les analyses de surfaces pour déterminer la porosité du

chitosane (la microscopie électronique à balayage a des grossissements encore plus importants que ceux utilisés dans cette étude ou encore la BET).

3.2.2.7. Résultats d'activité microbiologique de chitosane :

Tableau3.10 : l'activité microbiologique du chitosane à 1 %.

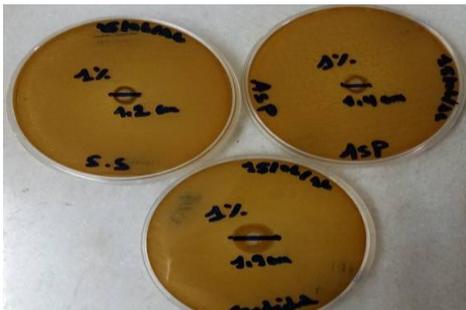
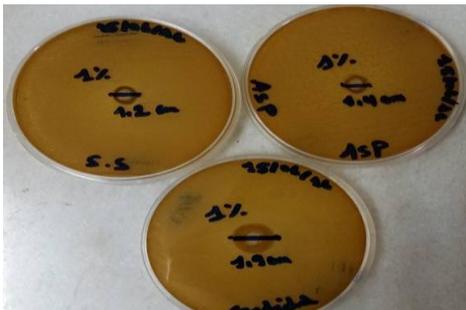
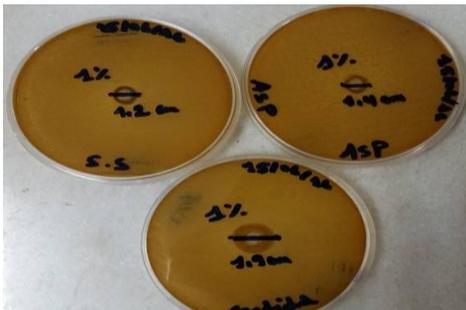
L'activité	Concentration du chitosane 1%	l'observation
Les bactéries:		
<i>Escherichia coli</i>		Non sensible (-)
<i>Staphylococcus aureus</i>		Non sensible (-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Non sensible (-)
Bacilles		Non sensible (-)
de champignons :		
<i>Candidas albicans</i>		Très sensible (++)
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

Tableau 3.11 : l'activité microbiologique du chitosane à 1.5 %.

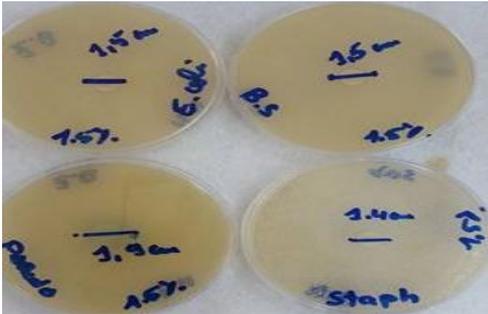
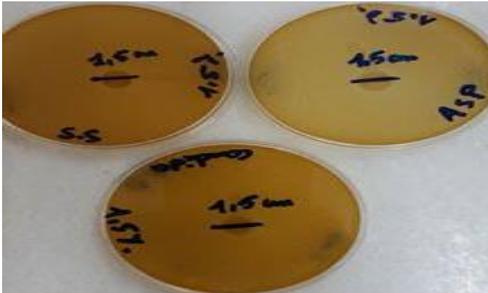
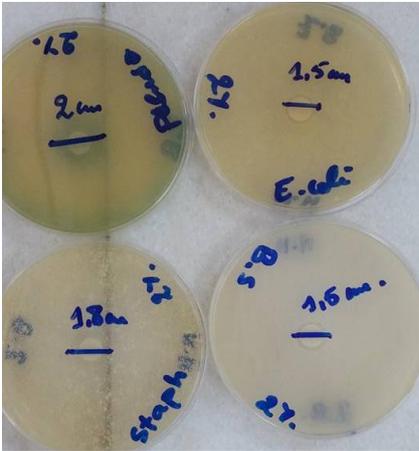
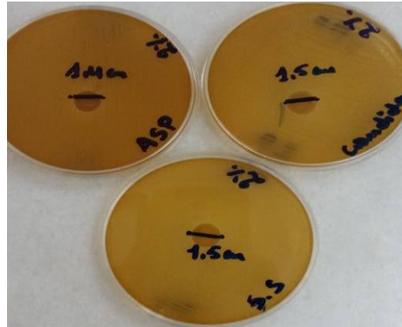
L'activité	Concentration du chitosane 1.5%	l'observation
<u>Les bactéries:</u>		
<i>Escherichia coli</i>		Très sensible (++)
<i>Staphylococcus aureus</i>		Sensible (+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Très sensible (++)
<i>Bacilles</i>		Très sensible (++)
<u>de champignons :</u>		
<i>Candidas albicans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

Tableau 3.12 : l'activité microbiologique du chitosane à 2 %

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

de champignons :*Candidas albicans**Aspergillus fumigatus**Saccharomyces cerevisiae*

Très sensible (++)

Sensible (+)

Très sensible (++)

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

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

3.2.3. Caractérisation physico-chimique de nos formulations :

A partir de la matrice d'expériences tableau 3.6, on réalise les 14 essais de la formulation. Ces derniers sont réalisés selon la formule et le procédé décrit.

Sur chacun des essais, des contrôles visuel et de formulation sont effectués conformément aux exigences pharmaceutiques dont les protocoles opératoires sont décrits 3.1.3.4.

3.2.3.1. Résultat du contrôle du pH et mesure de la densité :

Les résultats de mesure du pH ainsi que les densités sont regroupés dans le tableau 3.13 :

Tableau 3.13 : Les résultats de mesure du pH et les densités des formulations

Essais	PH	Densité
1	7.75	1.030
2	7.30	1.035
3	7.26	1.006
4	7.83	1.033
5	7.54	1.010
6	7.60	1.035
7	7.47	1.015
8	7.48	1.015
9	7.65	1.025
10	7.46	1.015
11	7.40	1.015
12	7.41	1.015
13	7.90	1.035
14	7.55	1.015

D'après les résultats obtenus, on remarque que le pH des suspensions finales des différents essais réalisés sont neutres, ce qui assure la non-solubilité du chitosane dans le système.

D'après les résultats de la mesure de la densité des essais de la matrice d'expérience réalisés en utilisant un densimètre, on a pu constater que la densité de toutes les suspensions préparées est pratiquement proche de 1.

3.2.3.2. Résultats du test de gélification in-situ :

Des observations visuelles ont montrés que pour les 14 essais, une formation d'un gel a été constatée lors qu'on introduit ces derniers dans un milieu acide à 37°C (simulation d'un liquide gastrique pH=1,2).

La formation du gel bien définies comme illustré dans la figure 3.9 résulte de la réaction de complexations poly-électrolytes entre le chitosane qui un polycation et alginate de sodium qui est un poly anion introduisant les interaction électrostatiques

entre les deux polymères qui se produit dans l'environnement simulé au milieu gastrique [37].



Figure 3.9 : Image du gel d'alginate de sodium et du chitosane.

Ce type d'interaction attractive mise en jeu par la présence d'interaction électrostatique entre les groupes carboxyle de l'alginate et le groupe amine de Chitosane, les liaisons hydrogène entre le groupement carboxylique et le groupement amine et des liaisons de Van der Waals existante de force de Colomb interactif qui augmente le degré de couplage transversal la création de ces liaisons est liée à la diminution de l'énergie libre, ce type de liaisons interviennent dans la formation entre le Chitosane et Alginate de sodium [38].

3.2.3.3. Résultats de l'étude rhéologique des suspensions :

Nous présentons dans cette partie l'étude des propriétés rhéologiques des différentes suspensions Appendice B. L'évolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour différentes suspensions est représentée sur la figure 3.10, on observe deux parties dont l'évolution de la viscosité : un premier domaine caractéristique d'un comportement newtonien (viscosité constante en fonction de la vitesse de cisaillement) et un deuxième typique d'un système rhéo-fluidifiant (la diminution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement).

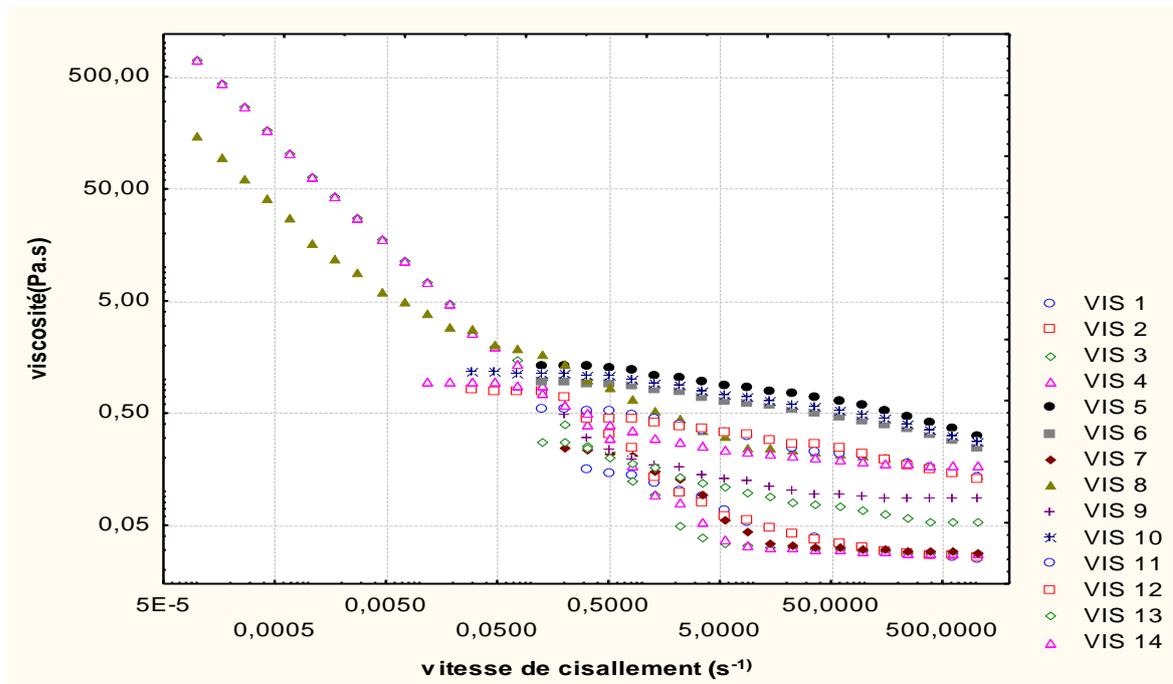


Figure 3.10 : Evolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour les différentes suspensions.

Afin de quantifier l'influence de cisaillement, on se propose dans ce qui suit d'ajuster les courbes expérimentales par des modèles rhéologiques usuels simples.

Nos données expérimentales ont été analysées à l'aide de l'équation de Carreau et Casson (voir Appendice B) qui ont souvent été utilisées pour décrire le comportement des polysaccharides en solution [39].

La détermination des paramètres rhéologique de ces modèles est obtenue par des méthodes d'optimisation non linéaire en se basant sur un calcul itératif.

Ces méthodes de calcul, effectuées sur le logiciel STATISTICA en utilisant les itérations Simplex, Hooke-Jeeves pattern moves, et Rosenbrock pattern search, sont intéressantes car elles évitent les minimums locaux et deviennent très efficaces lorsqu'elles sont combinées à la méthode de Quasi-Newton qui a l'avantage d'identifier un vecteur initial pour le lancement du processus itératif.

En analysant le tableau 3.6, il apparaît clairement que pour les suspensions (1.2.5.6.7.10.11.12.13.14) la viscosité au faible cisaillement a tendance à enregistrer un palier qui se traduit par la première région newtonienne.

On note toutefois l'absence de la deuxième région newtonienne dans certaine suspension pour laquelle la viscosité est représentée par la viscosité à l'état infini η_{∞} .

Pour les suspensions (3-4-8-9) sont pourvues d'une plasticité (présence de la contrainte seuil τ_0), c'est pour cela qu'on a présenté les courbes d'écoulement en terme de viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement, afin d'apprécier le comportement de ces produits au faible cisaillement est voir que la viscosité qui tend vers l'infinie, ce qui se traduit par un comportement plastique.

Le rhéogramme montre une courbe de viscosité en fonction de la vitesse de déformation figure 3.11, en échelle double logarithmique, montre existence de régions distincts[40] :

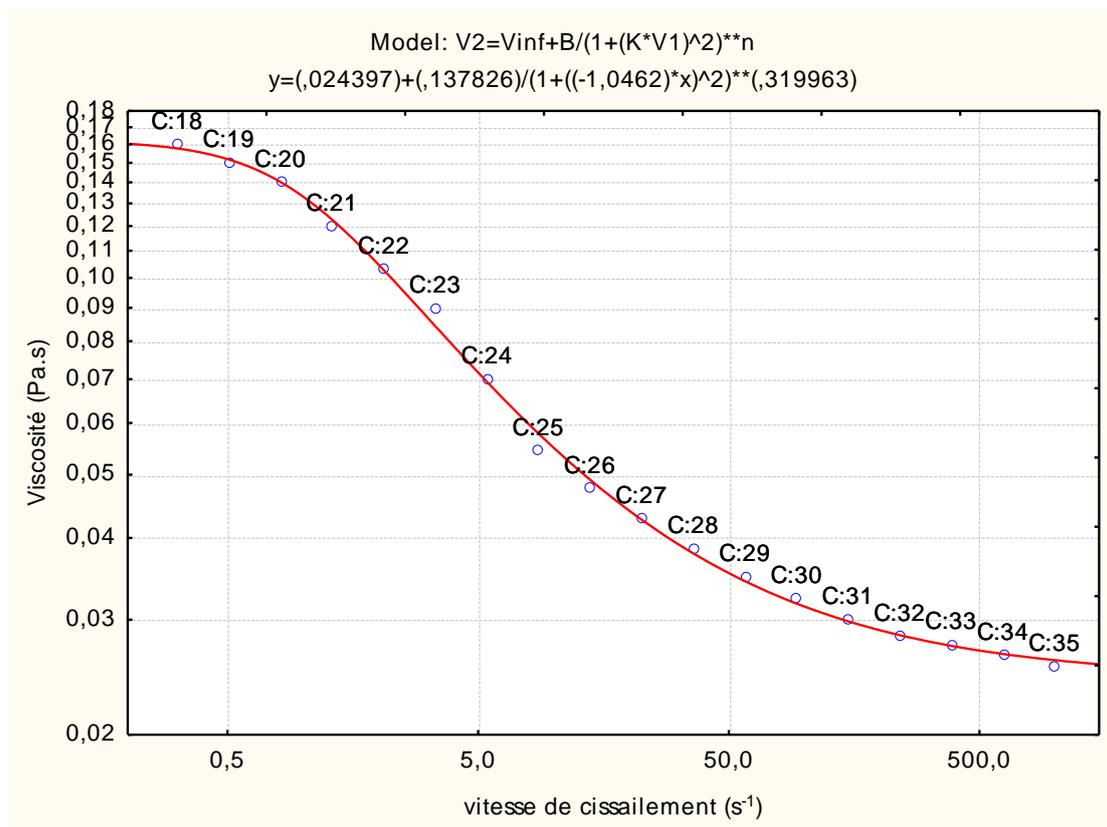


Figure 3.11 : Courbe d'écoulement de viscosité de l'essai n°01.

❖ Dans la première zone, où le comportement est supposé newtonien, la valeur limite de cette zone correspond à une vitesse de cisaillement est d'environ $\dot{\gamma} = 0.01 \text{ s}^{-1}$.

Dans ce domaine, on distingue deux phénomènes antagonistes qui coexistent, générant ainsi un comportement newtonien avec $\eta_0 = \text{constante}$.

- Une déstructuration partielle de la structure due à la présence de force de cisaillement de répulsion sous un très faible cisaillement ($\dot{\gamma}$ très petit).
- Une réorganisation partielle de la structure des macromolécules, due aux forces d'attraction de Van Der Waals.

La résultante de la déstructuration et de la réorganisation partielle des macromolécules est alors nulle et par conséquent, la structure ne subit aucun changement significatif qui puisse générer une modification de la résistance à l'écoulement. De ce fait, la viscosité augmente et diminue en même temps et donc reste stable et devient constante. C'est la viscosité pour le taux de cisaillement nul. Les autres suspensions présentant le même profil sont présentées en (voir Appendice C).

3.2.3.4. Résultats du contrôle de la stabilité des suspensions :

Les résultats de l'étude stabilité effectuée sur les suspensions issues des essais de la matrice d'expériences, et cela en suivant la sédimentation de la suspension au cours du temps, sont résumés dans le tableau 3.14.

Tableau 3.14 : Résultats de l'étude de stabilité effectuée sur les suspensions issues de la matrice d'expérience

N° Essai	Durée de mise en stabilité des suspensions									
	J1	J2	J3	J4	J5	S1	S2	S3	1 Mois	2 Mois
01	Stable	Stable	Instable							
02	Stable	Stable	Instable							
03	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Instable	Instable	Instable	Instable	Instable
04	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable
05	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable
06	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable
07	Stable	Stable	Stable	Stable	Instable	Instable	Instable	Instable	Instable	Instable
08	Stable	Instable								
09	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable
10	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable
11	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Instable	Instable	Instable	Instable
12	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Instable	Instable	Instable	Instable	Instable

13	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Instable	Instable	Instable	Instable	Instable
14	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Instable	Instable	Instable	Instable

Les suspensions préparées en utilisant une concentration élevée (Valeur maximale de l'intervalle de l'étude) Chitosane 2 g/100 ml, elles présentent une stabilité tout au long de la durée de l'étude de stabilité effectuée (2 mois), citant l'exemple de l'essai N° 04, 06, 09, 10, et cela même à faible concentration en alginate de sodium

(3 g/100 ml).

- ✓ Une stabilité est observée pour le cas de l'essai réalisé à une concentration élevée en alginate de sodium (7/100 ml) et à une concentration intermédiaire en Chitosane.
- ✓ Pour les suspensions préparées à faible concentration en alginate de sodium et en Chitosane (valeur minimale pour chaque ingrédient), les suspensions (01,02), présentent une forme d'instabilité après 48 heures de leur préparation.
- ✓ Pour le reste des suspensions préparées la stabilité est assurée d'une à deux semaines de la préparation.

3.2.3.5 Résultats du contrôle de la stabilité des suspensions par rhéologie:

Les résultats de l'étude de stabilité effectuée sur les suspensions issues des essais de la matrice d'expériences, et cela par le test de rhéologie en traçant le module de conservation qui correspond à l'énergie élastique emmagasinée pendant l'expérience (G') exprimé en (Pa) en fonction de la fréquence angulaire exprimé en (rad/s). représenté dans la figure 3.12. (voir appendice E).

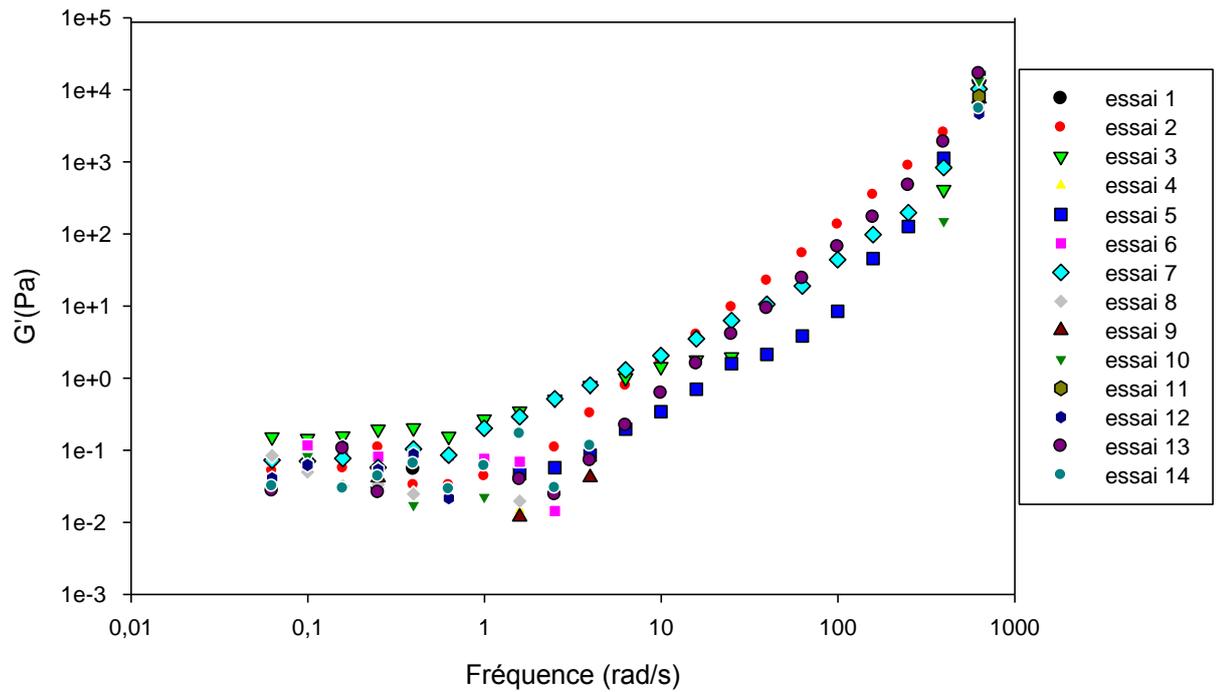


Figure 3.12 : Evolution du module de conservation en fonction de la fréquence angulaire pour les différentes suspensions.

Un plateau est observé aux alentours de 0,01 à 1(rad/s) ce qui veut dire que la fréquence est l'inverse de la période c'est-à-dire 100s, cela veut dire qu'on a une stabilité aux cours du temps, par conséquent plus le temps augmente plus on a une stabilité.

Conclusion

Ce mémoire de fin d'études a eu pour objectif de faire une extraction d'un biopolymère biodégradable qui joue le rôle d'un conservateur nommé chitosane et de mettre au point une suspension médicamenteuse à base d'un principe actif à libération prolongée. L'extraction du chitosane nous a permis d'obtenir un produit de qualité ultra-pure avec

Un DDA de 93% par rapport au chitosane commerciale est de 85% ce qui permet son utilisation dans le domaine pharmaceutique.

La liaison Alginate/Chitosane s'effectue au travers des liaisons ioniques entre les fonctions carboxylates déprotonées (chargées négativement) de l'alginate de sodium et les fonctions amines primaires protonées du chitosane (chargés positivement) aboutissant à la formation d'une structure tridimensionnelle dont la porosité est liée à la densité d'enchevêtrement des chaînes macromoléculaires des deux biopolymères .

L'étude de modélisation rhéologique des suspensions par le modèle structural de Carreau et Casson ont permis de dégager les paramètres caractéristiques qui seront utiles pour cerner le domaine auquel les suspensions présentent un comportement rhéologique satisfaisant.

Une étude de stabilité de ces suspensions a été étudié par le rhéomètre MCR 302, un plateau est observé aux alentours de 0,01 à 1(rad/s) ce qui veut dire que la fréquence est l'inverse de la période c'est-à-dire 100s, cela veut dire qu'on a une stabilité aux cours du temps, par conséquent plus le temps augmente plus on a une stabilité.

APPENDICE A

Tableau : Résultat de titrage potentiométrique

V(ml)	0	0.1	0.3	0.4	0.7	0.9	1	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5
pH	2.32	2.32	2.32	2.32	2.35	2.36	2.38	2.39	2.4	2.41	2.42	2.43

V(ml)	1.6	1.7	1.8	1.9	2	2.1	2.3	2.4	2.5	2.6	2.8	2.9
pH	2.44	2.45	2.46	2.47	2.48	2.49	2.50	2.51	2.51	2.52	2.54	2.55

V(ml)	3	3.3	3.4	3.5	3.8	4	4.1	4.2	4.3	4.4	4.6	4.8
pH	2.56	2.59	2.60	2.61	2.64	2.65	2.68	2.70	2.70	2.72	2.79	2.79

V(ml)	5	5.1	5.2	5.4	5.5	5.6	5.8	6	6.2	6.4	6.5	6.6
pH	2.83	2.93	2.94	2.96	3	3.04	3.18	3.24	3.46	3.57	3.72	3.83

V(ml)	6.7	6.8	6.9	7	7.2	7.3	7.4	7.5	7.6	7.7	7.8	7.9
pH	3.95	4.08	4.18	4.26	4.36	4.44	4.45	4.54	4.56	4.63	4.70	4.77

V(ml)	8.1	8.2	8.5	8.6	8.8	8.9	9	9.1	9.2	9.3	9.4	9.5
pH	4.81	4.83	4.92	4.95	5.01	5.03	5.06	5.1	5.19	5.23	5.27	5.32

V(ml)	9.7	9.8	9.9	10	10.1	10.2	10.4	10.5	10.6	10.8	11	11.1
pH	5.36	5.39	5.42	5.46	5.5	5.54	5.58	5.60	5.65	5.70	5.74	5.77

V(ml)	11.2	11.4	11.5	11.6	11.7	11.9	12	12.1	12.2	12.3	12.4	12.5
pH	5.79	5.82	5.87	5.89	5.95	5.98	6	6.03	6.06	6.09	6.12	6.14

V(ml)	12.6	12.8	12.9	13	13.1	13.2	13.3	13.5	13.6	13.7	13.8	14
pH	6.16	6.19	6.22	6.24	6.26	6.28	6.30	6.32	6.34	6.36	6.39	6.40

V(ml)	14.1	14.3	14.4	14.5	14.6	14.7	14.8	15	15.1	15.2	15.4	15.5
pH	6.44	6.48	6.50	6.50	6.51	6.53	6.56	6.60	6.64	6.65	6.68	6.72

V(ml)	15.6	15.7	15.8	15.9	16.1	16.3	16.5	16.6	16.8	16.9	17	17.1
pH	6.74	6.76	6.77	6.78	6.80	6.85	6.89	6.92	6.95	6.98	7.03	7.06

V(ml)	17.2	17.3	17.4	17.5	17.6	17.7	17.8	17.9	18	18.2	18.3	18.4
pH	7.09	7.12	7.20	7.30	7.40	7.56	7.76	8.06	9.08	9.48	9.71	9.95

V(ml)	18.5	18.6	18.7	18.8	18.9	19	19.1	19.2	19.3	19.4	19.5	19.6
pH	10.12	10.29	10.40	10.54	10.67	10.72	10.88	10.86	10.91	10.97	11.01	11.06

V(ml)	19.7	19.9	20	20.1	20.2	20.4	20.5	20.6	20.7	20.8	21	21.2
pH	11.11	11.15	11.18	11.22	11.25	11.28	11.30	11.33	11.35	11.37	11.39	11.41

V(ml)	21.3	21.4	21.5	21.6	21.7	21.8	21.9	22.1	22.2	22.3	22.4	22.5
pH	11.42	11.43	11.45	11.46	11.47	11.49	11.50	11.52	11.53	11.54	11.55	11.56

V(ml)	22.6	22.8	22.9	23	23.1	23.2	23.3	23.5	23.6	23.7	23.8	23.9
-------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------

pH	11.57	11.58	11.60	11.61	11.62	11.62	11.63	11.64	11.65	11.66	11.67	11.68
----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

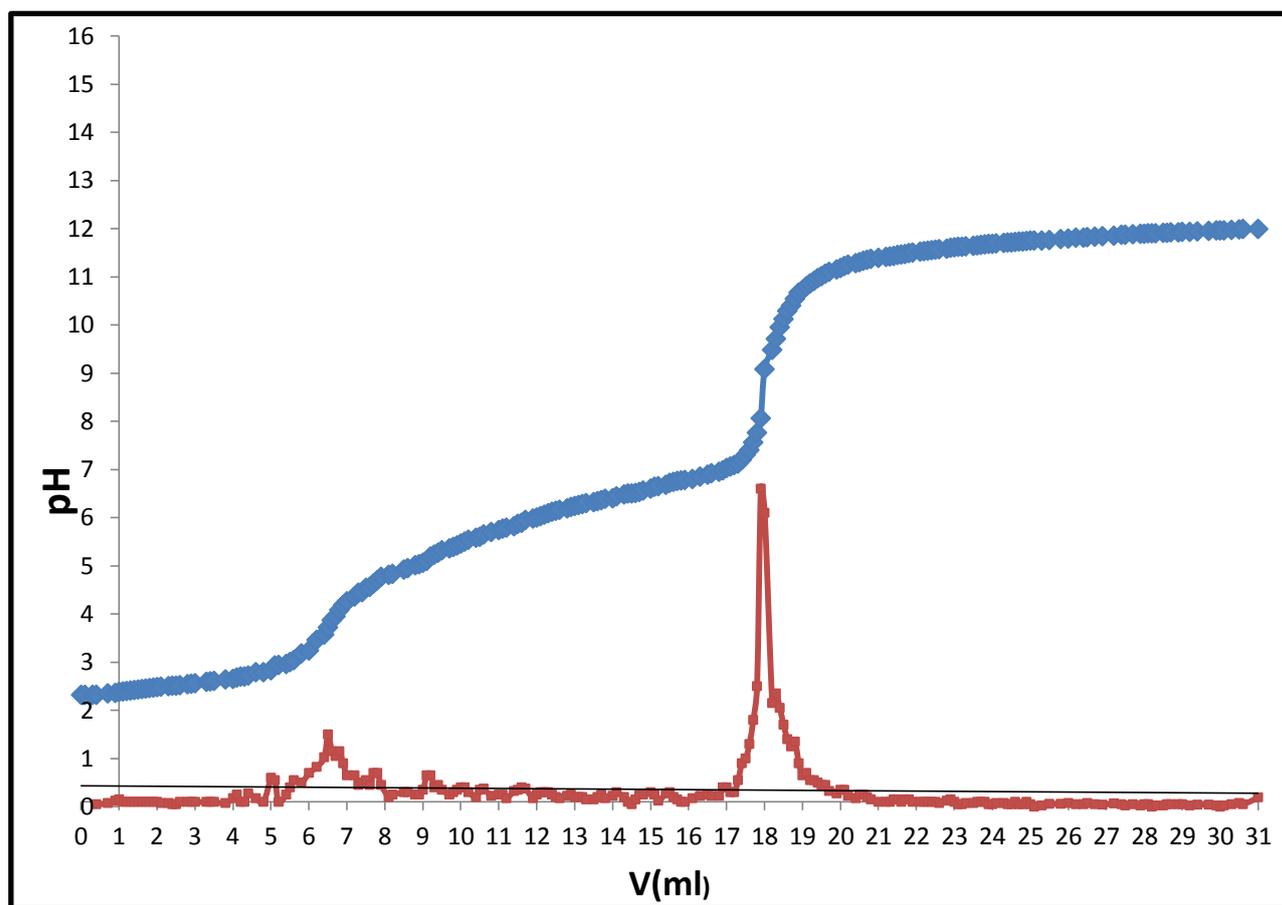
V(ml))	24	24.1	24.3	24.4	24.5	24.6	24.7	24.8	24.9	25	25.1	25.3
pH	11.68	11.69	11.70	11.71	11.71	11.72	11.73	11.73	11.74	11.75	11.75	11.75

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

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

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

Figure : Corurbe titrage potentiométrique :



APPENDICE B

Modèle de Carreau :

$$\frac{\mu - \mu_{\infty}}{\mu_0 - \mu_{\infty}} = \frac{1}{(1 + (k\dot{\gamma})^2)^n}$$

Avec μ_0 : Viscosité a $\tau_0 \rightarrow 0$ (Pa.s)

μ_{∞} : Viscosité a $\tau_{\infty} \rightarrow \infty$ (Pa.s)

K : Constante de Carreau

n : Exposant de Carreau

Modèle de Casson :

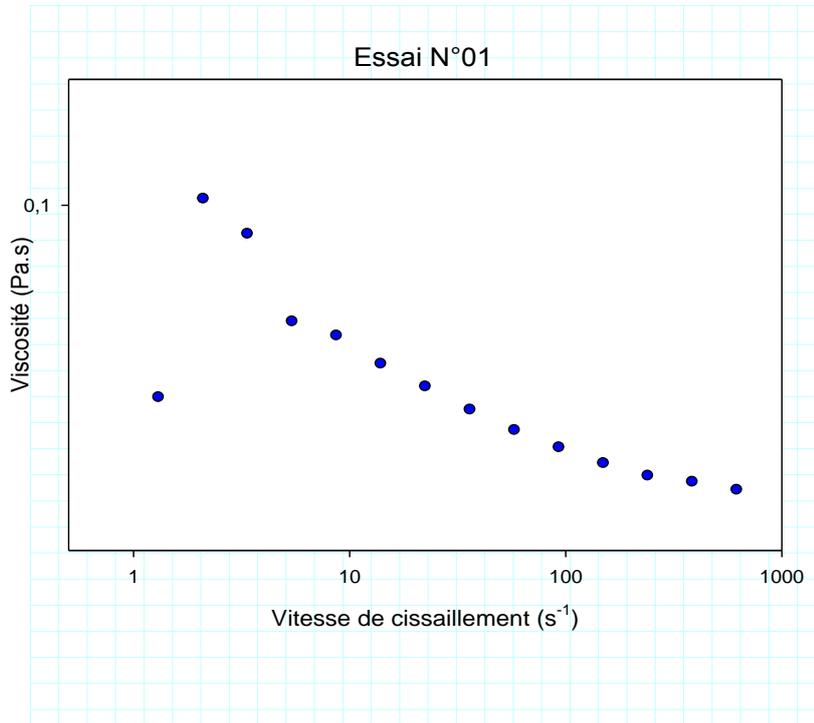
$$\tau^{\frac{1}{2}} = \tau_0^{\frac{1}{2}} + \mu_c^{\frac{1}{2}} \dot{\gamma}^{\frac{1}{2}}$$

Avec μ_c : viscosité de casson (Pa .s)

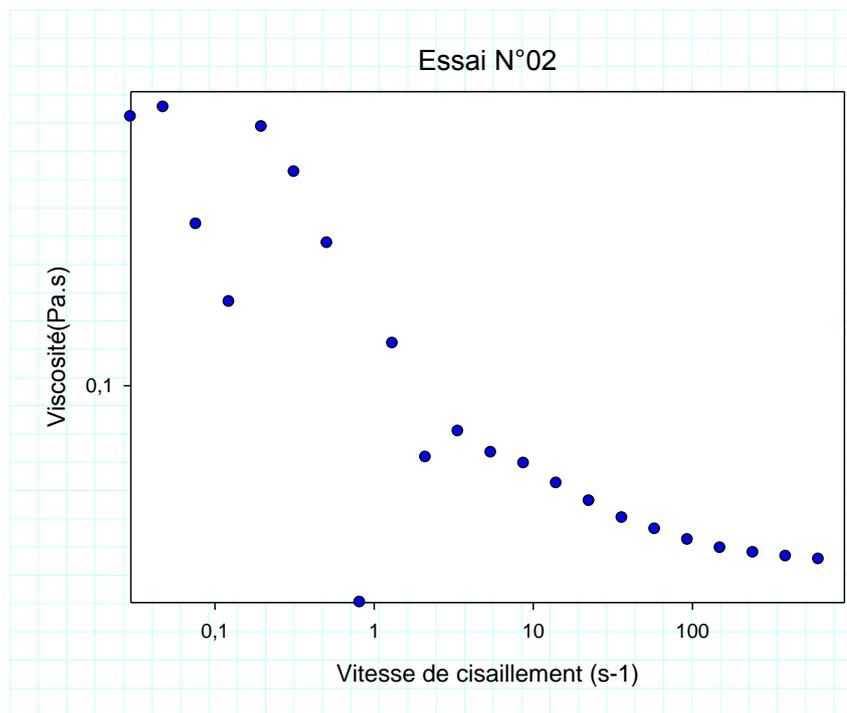
τ_0 : Contrainte seuil (Pa)

$\dot{\gamma}$:Vitesse de cisaillement (s^{-1})

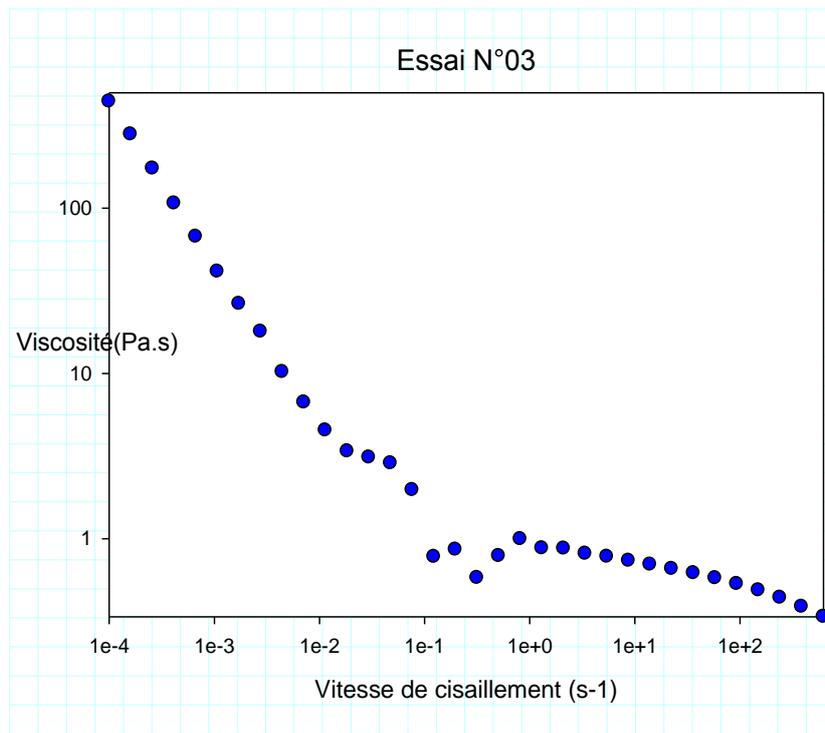
APPENDICE C



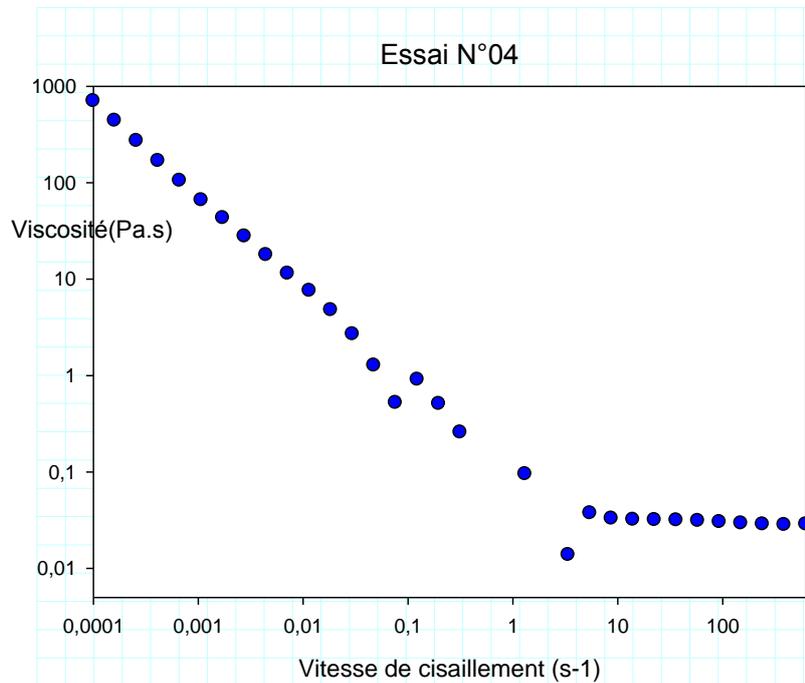
Courbe de l'écoulement de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement de l'essai 01



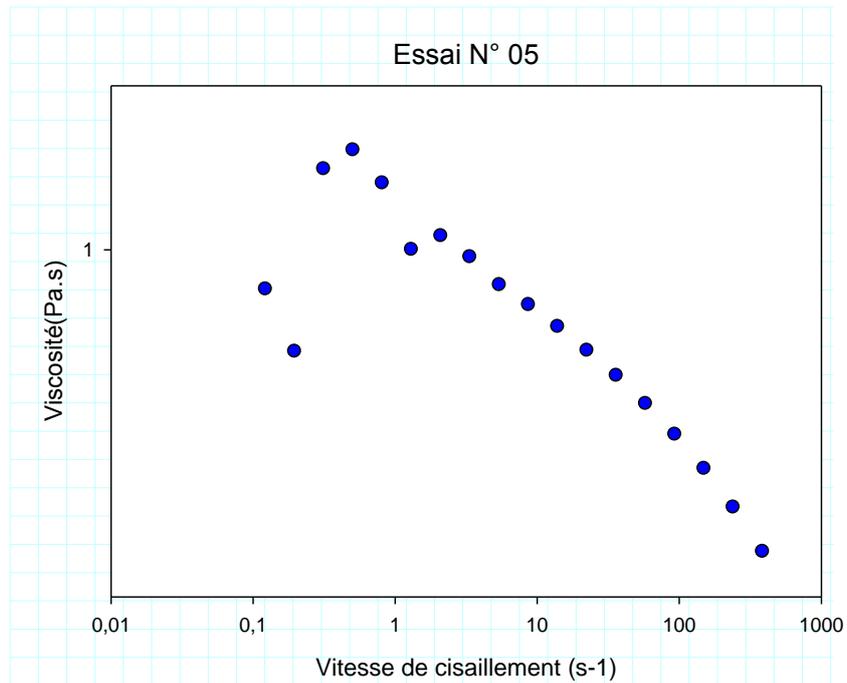
Courbe de l'écoulement de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement de l'essai 02



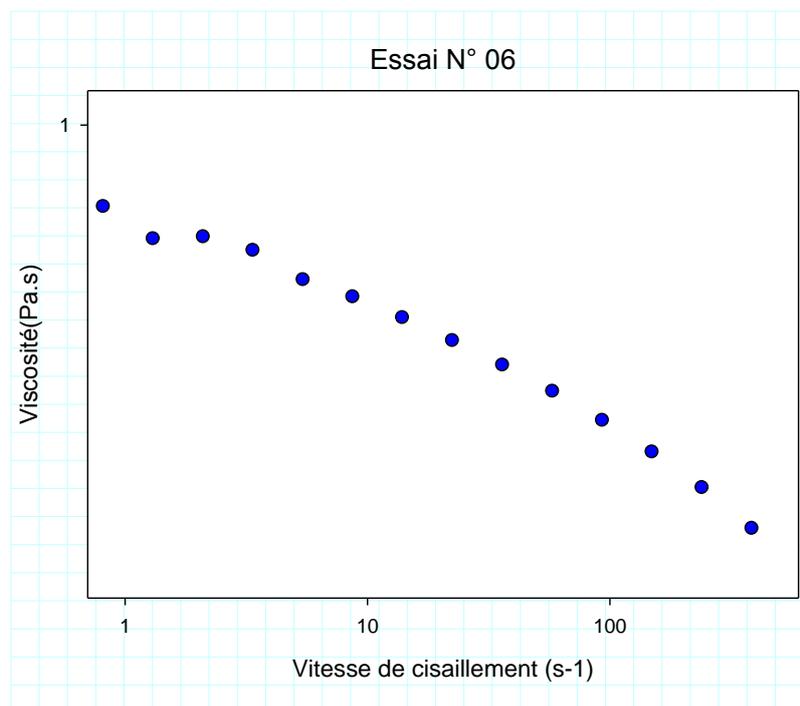
Courbe de l'écoulement de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement de l'essai 03



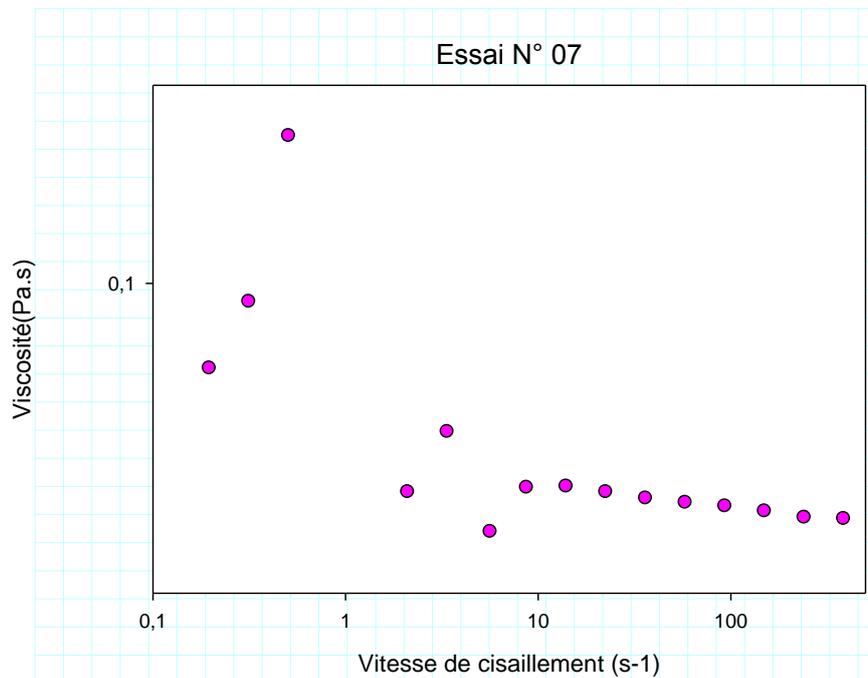
Courbe de l'écoulement de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement de l'essai 04



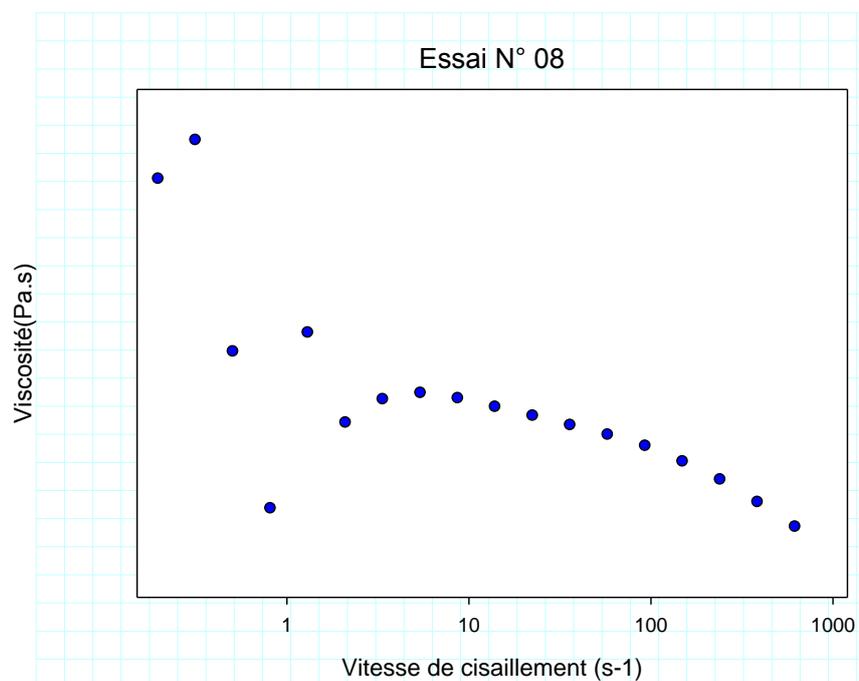
Courbe de l'écoulement de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement de l'essai 05



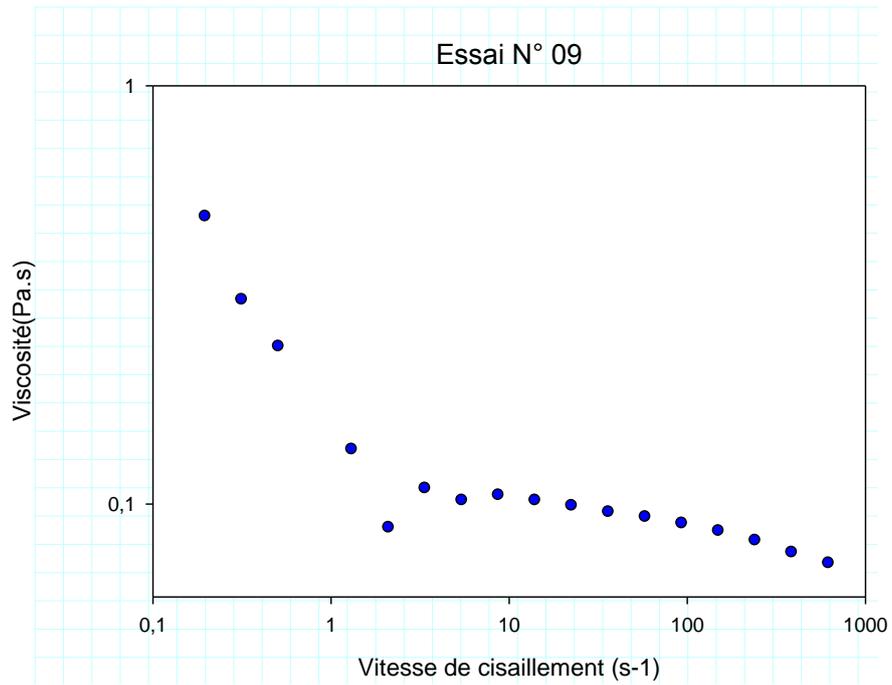
Courbe de l'écoulement de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement de l'essai 06



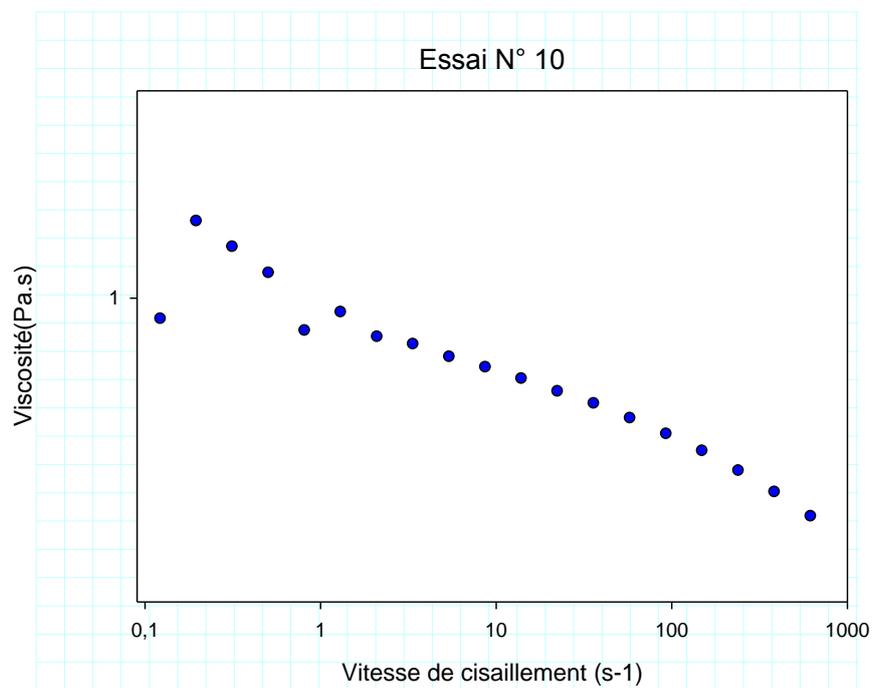
Courbe de l'écoulement de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement de l'essai 07



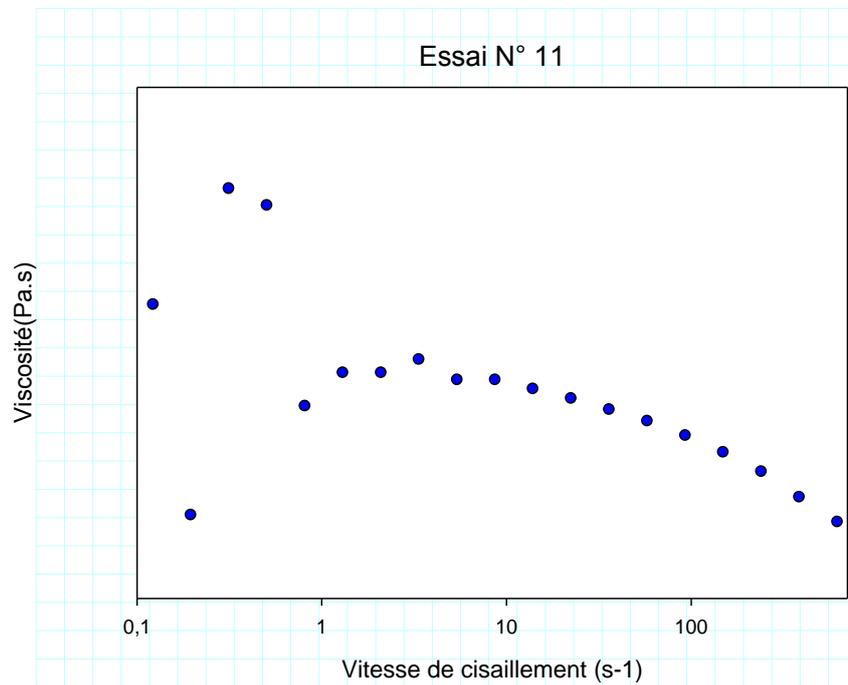
Courbe de l'écoulement de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement de l'essai 08



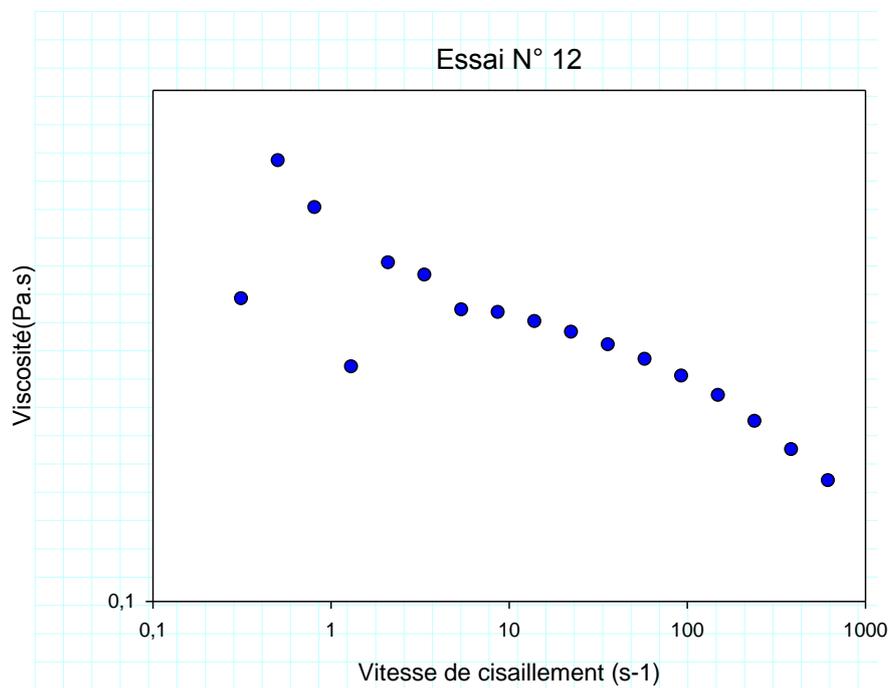
Courbe de l'écoulement de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement de l'essai 09



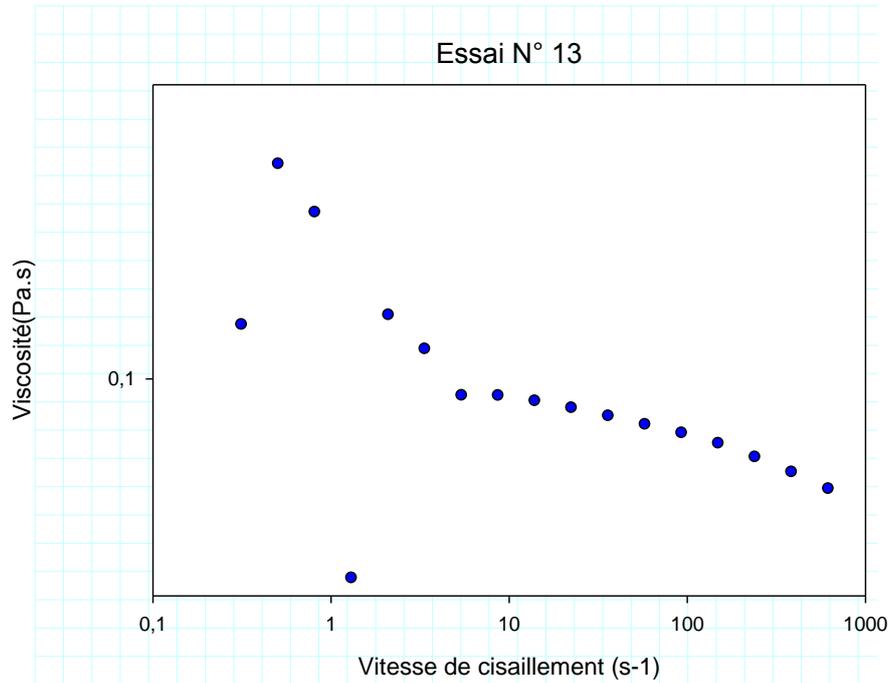
Courbe de l'écoulement de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement de l'essai 10



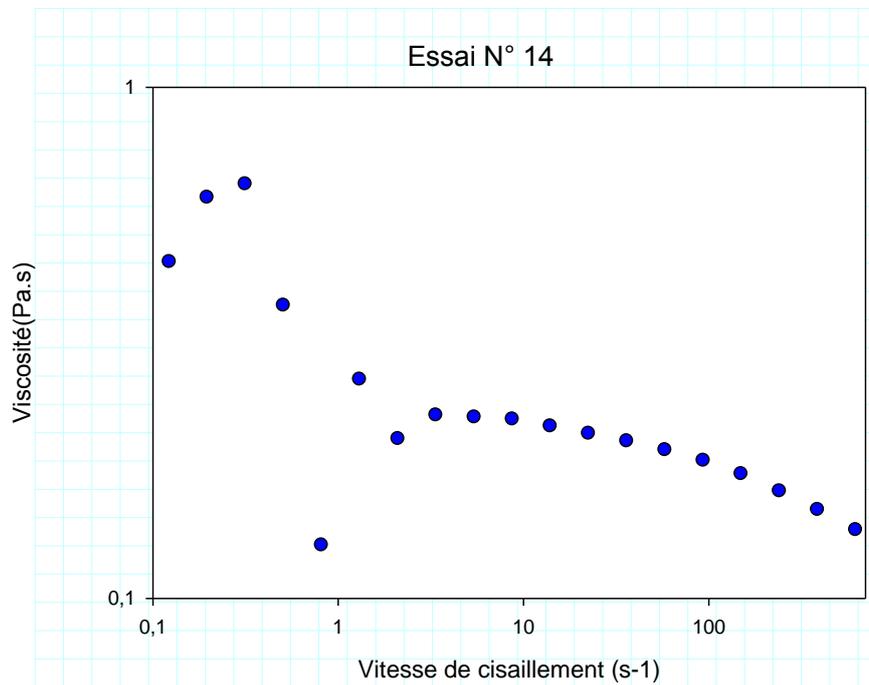
Courbe de l'écoulement de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement de l'essai 11



Courbe de l'écoulement de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement de l'essai 12



Courbe de l'écoulement de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement de l'essai 13



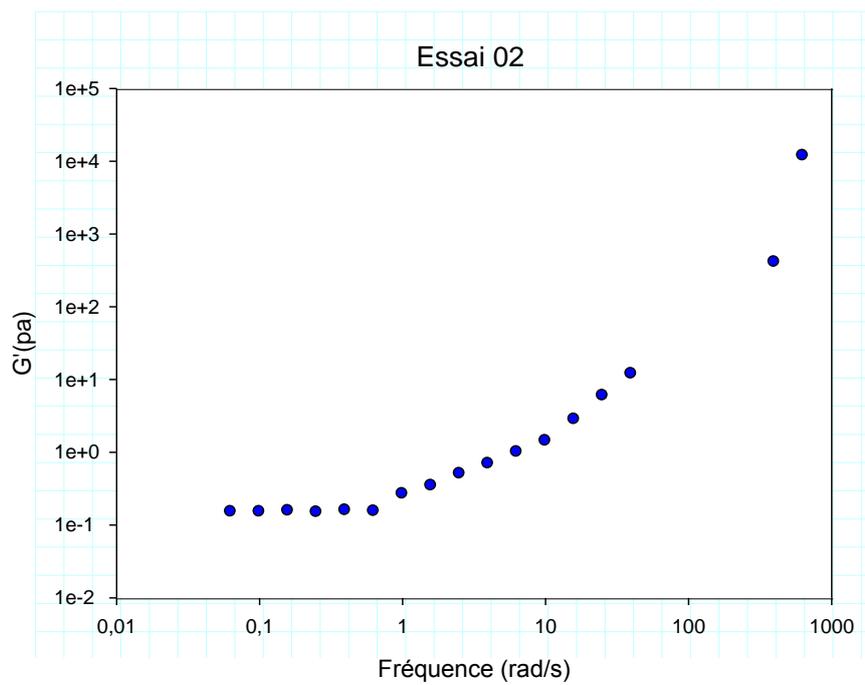
Courbe de l'écoulement de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement de l'essai 14

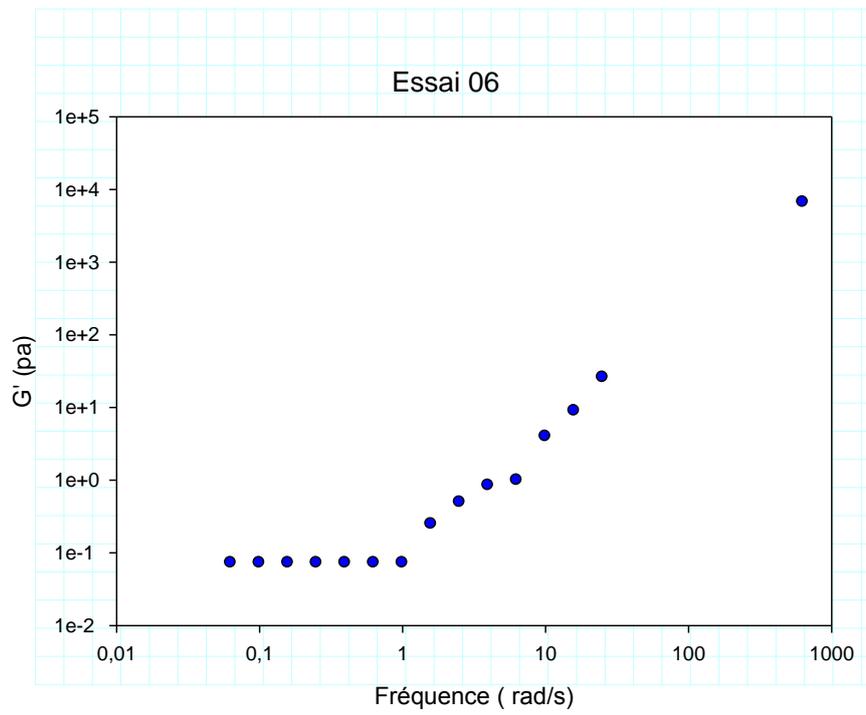
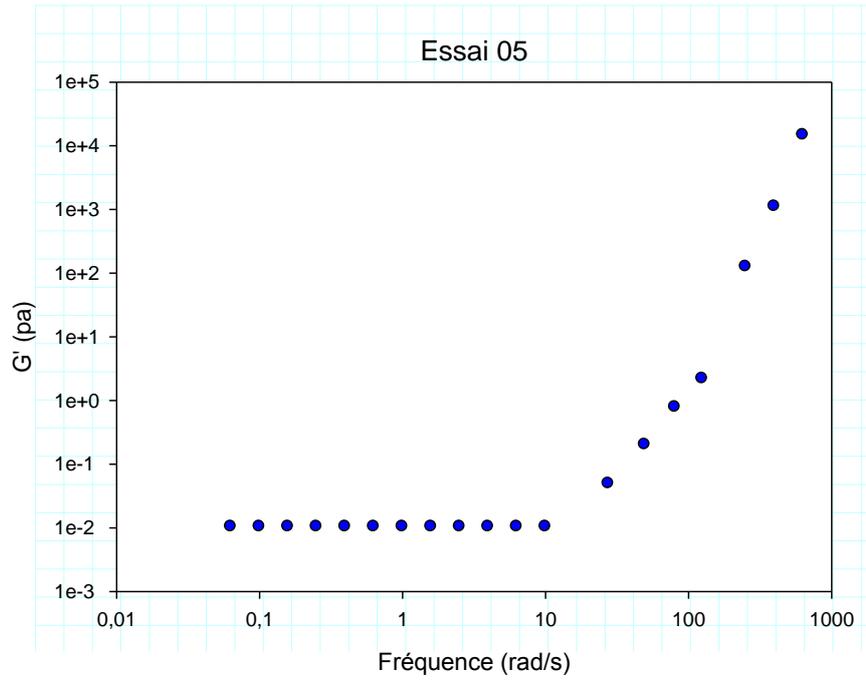
APPENDICE D

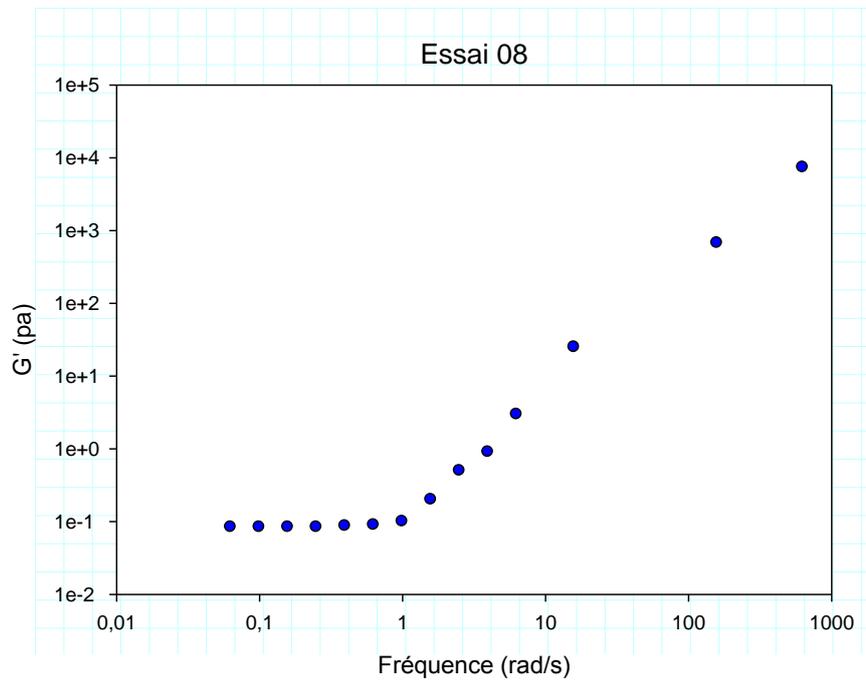
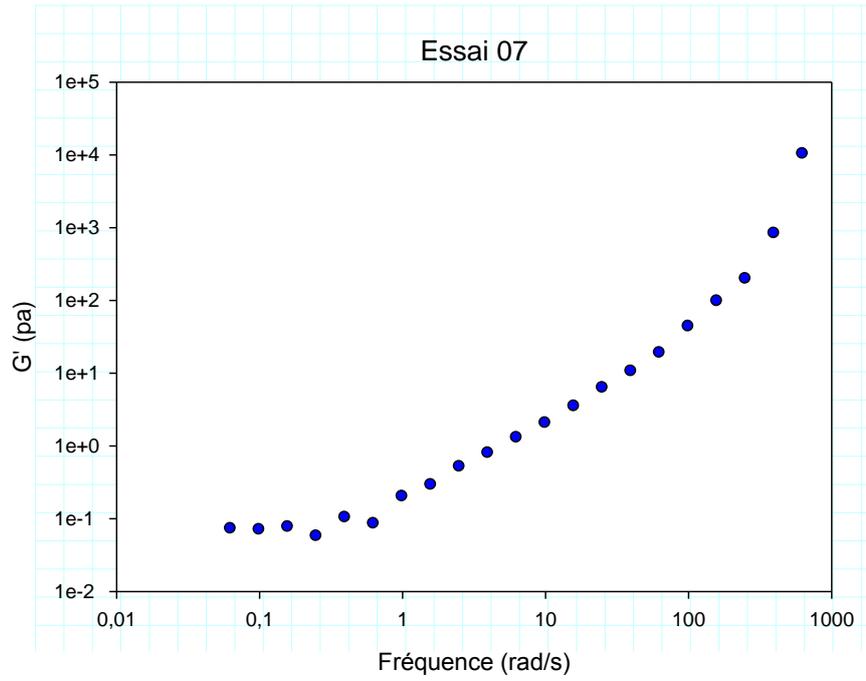
Représentation structurale de la réaction de formation de l'ion complexe chitosane -alginate de sodium

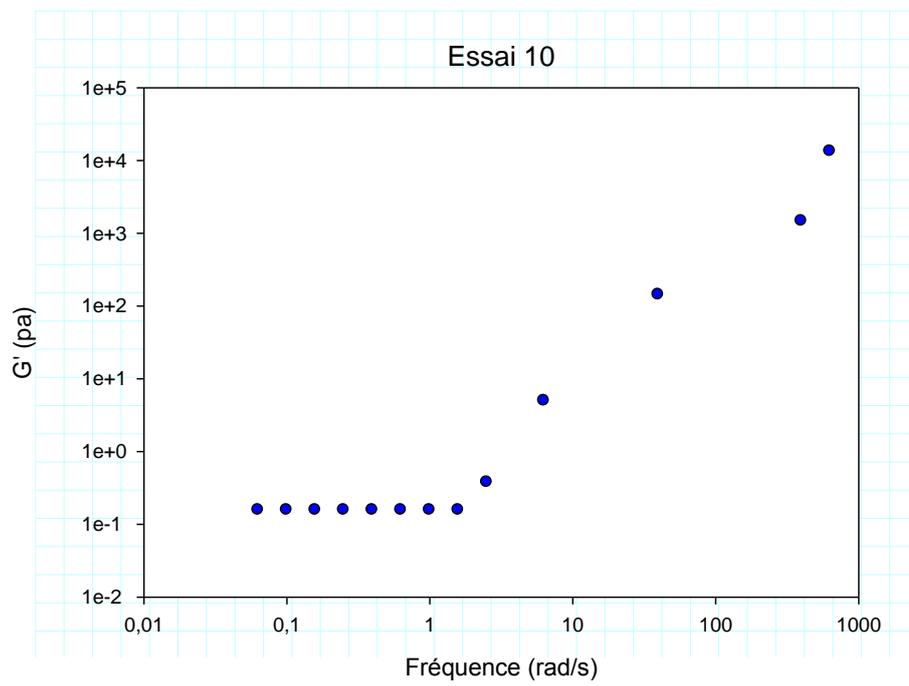
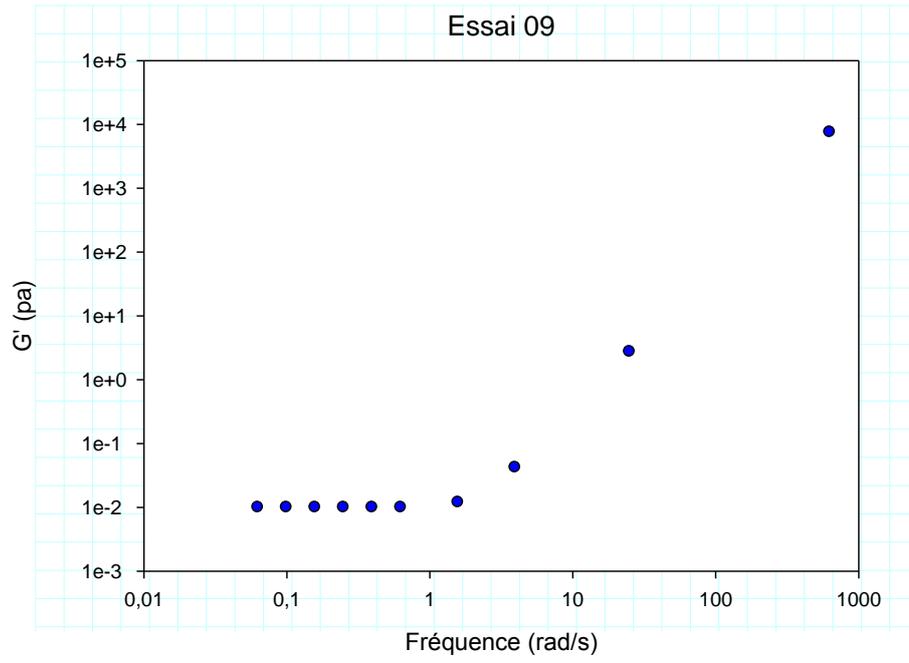


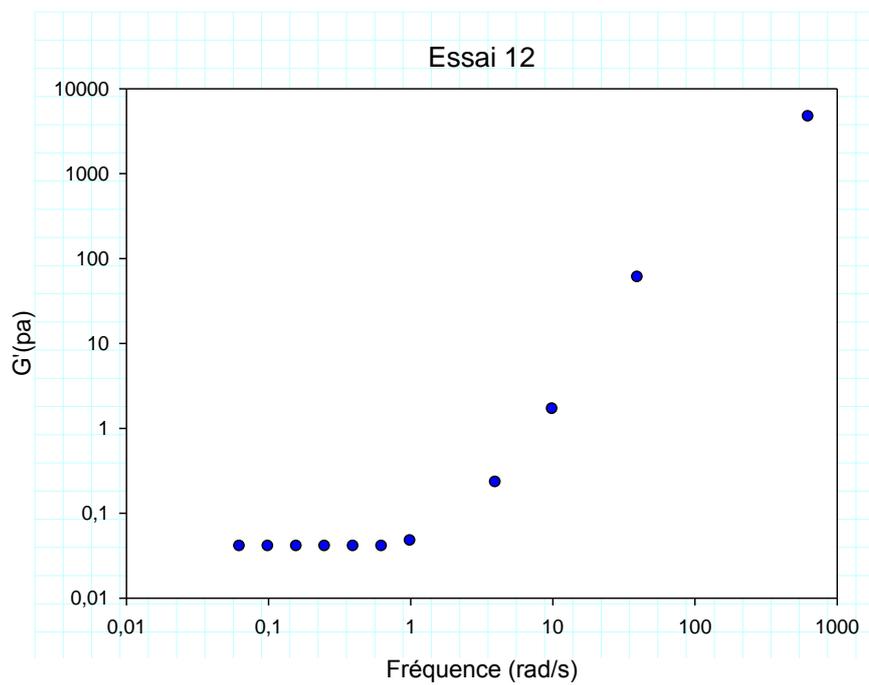
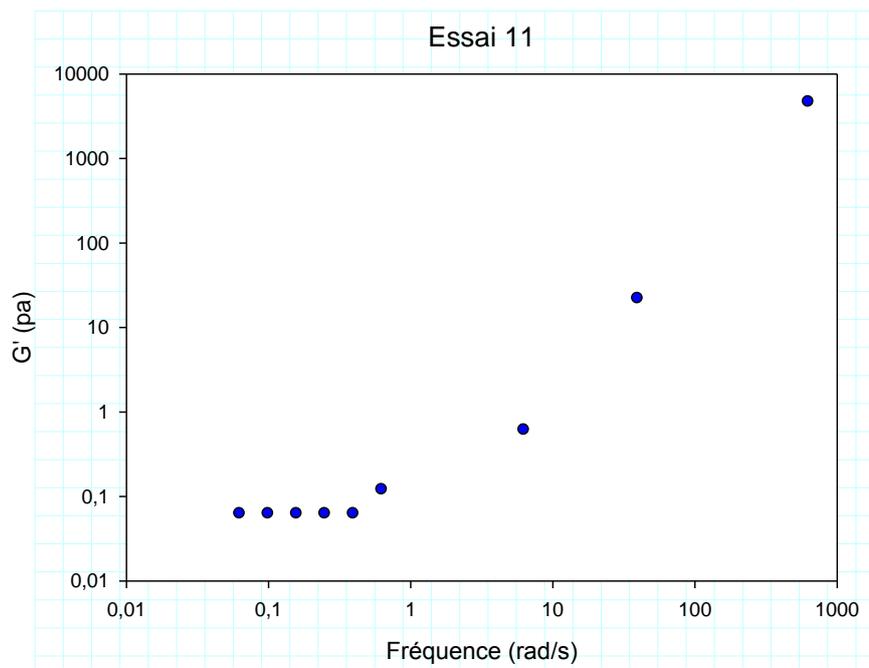
APPENDICE E

**Evolution du module de conservation en fonction de la fréquence
angulaire pour les différentes suspensions**









Références bibliographiques

- [1] Pharmaceutique IU. MEDICAMENTS ESSENTIELS Avril 2004.
- [2] Lechat PP. Pharmacologie. 18 octobre 2006.
- [3] DJEWE DW. Technologique du Médicament. 2010/2011.
- [4] STANKE-LABESQUE DF. Aspects pharmacocinétiques, Pharmacologie. 2010/2011.
- [5] Lynne Whitehead JHC, John T. Fell Amoxycillin release from a floating dosage form based on alginates. international journal of pharmaceutics 2000.
- [6] Shozo Miyazaki WK, Kunihiko Itoh, Yasuhiro Konno, Mariko Fujiwaraa, Masatake Dairaku, Mitsuo Togashi, Ryozo Mikami, David Attwood. The effect of taste masking agents on in situ gelling pectin formulations for oral sustained delivery of paracetamol and ambroxol. INTERNATIONAL journal of pharmaceutics. 2005.
- [7] J-P. Guillemin « Rhéologie de suspensions concentrées de matériaux énergétiques recyclables – Modélisation du temps de coulée », thèse de doctorat, 2008.
- [8] I. Ould Amar et I. Dendan « contribution à la formulation d'une suspension médicamenteuse à libération prolongée à base de paracétamol ». Thèse de master. Université Saad dahleb, Blida. 2010.

- [9] L. Schramm « emulsions, Foams and Suspensions; Fundamentals and application », ISBN:978-3-527- 30743-2-643p, 2005.
- [10] M. Chabni « Etude de la stabilité physique des systèmes dispersés », thèse de doctorat, 2012.
- [11] R. Naveen Kumae. « Pharmaceutical technology », Srinivasa Rao College of Pharmacy. Vol 3(10), 985-995, 2011.
- [12] A. Bouhaouche « Formulation d'une suspension médicamenteuse à libération prolongée », thèse de magister, USTHB, Algérie, 2011.
- [13] E. Kissa « Dispersion Characterisation, Testing and Measurment », Surfactant Sciences Series vol 84, 1ere edition, p708. 1999.
- [14] M.H. Noel « Ciment à comportement rhéologique ajustable », thèse de doctorat, université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2009.
- [15] B. Cabane « Formulation des dispersions » Techniques de l'Ingénieur, traité Génie de procédés, J2. 185. 2003.
- [16] Ueno H, Mori. T and Fujinaga. T, *Topical formulations and wound healing applications of chitosan. Advanced Drug Delivery Reviews. 2001: p (105-115).*
- [17] Varum K.M, Myhr M.M, Hjerde R.J.N and Smidsrad. O, *In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. Carbohydrate Research. 1997: p (99- 101).*
- [18] Onishi. H and Machida. Y, *Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. Biomaterials. 1999: p (175-182).*
- [19] Ratajska. M and Boryniec. S, *Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers. Reactive and Functional Polymers.1998: p (35-49).*
- [20] Kurita. K, Kaji. Y, Mori. T and Nishiyama. Y, *Enzymatic degradation of chitin: Susceptibility and the influence of deacetylation. Carbohydrate Polymers. 2000: p (19-21).*
- [21] Tomihata. K and Ikada. Y *In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. Biomaterials. 1997: p (567-575).*
- [22] Chatelet. C, Damour. O and Domard. A, *Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. Biomaterials. 2001: p (261-268).*
- [23] Denuziere. A, Ferrier. D, Damour. O and Domard. A, *Chitosan – chondroitin sulfate and chitosan - hyaluronate polyelectrolyte complexes: Biological properties. Biomaterials. 1998: p (1275-1285).*

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

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

- [47] Liu W.G. and De Yao K. *Chitosan and its derivatives - a promising non-viral vector for gene transfection. Journal of Controlled Release. 2002: p (1-11).*
- [48] Kochkina Z.M. and Chirkov S.N. *Influence of chitosan derivatives on the development of phage infection in the Bacillus thuringiensis culture. Microbiology. 2000: p (217- 219).*
- [49] Schipper N.G.M, Olsson S, Hoogstraate J.A, deBoer A.G, Varum K.M. and Artursson P. *Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs .2. Mechanism of absorption enhancement. Pharmaceutical Research. 1997: p (923-929).*
- [50] Sajomsang. W, Tantayanon. S, Tangpasuthadol. V and Daly W.H, *Synthesis of methylated chitosan containing aromatic moieties: Chemo selectivity and effect on molecular weight. Carbohydrate Polymers. 2008: p (740-750).*
- [51] Qin C.Q, Du .Y.M, Xiao. L, Li. Z and Gao X.H, *Enzymic preparation of watersoluble chitosan and their antitumor activity. International Journal of Biological Macromolecules. 2002: p (111-117).*
- [52] Vinsova J. and Vavrikova E. *Chitosan Derivatives with Antimicrobial, Antitumour and Antioxidant Activities - a Review. Current Pharmaceutical Design. 2011: p (3596-3607).*
- [53] Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, Mikami T, Suzuki S and M S. *Growthinhibitory effect of hexa-N acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 1988: p (784–790).*
- [54] Pasanphan. W, Buettner G.R. and Chirachanchai. S, *Chitosan gallate as a novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study. Carbohydrate Research. 2010: p (132-140).*
- [55] Kim S.K. and Rajapakse N. *Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. Carbohydrate Polymers. 2005: p (357-368).*
- [56] A. MRA. *Chitin Handbook. 1998:47.*
- [57] STRUSZCZYK MH. *Chitin and Chitosan,APPLICATIONS OF*CHITOSAN*. POLIMERY 2002.*
- [58] IsabelleGOUJON. *Les Alginates:excipientsd'origine marineutilisésdansl'industrie pharmaceutique. 2004.*
- [59] VINCENT E. *LES ALGINATES ET LEURS APPLICATIONS EN PHARMACIE ET EN INGENIERIE 2010.*

- [60] FALLER h. Les application et la toxicite des algues marine 2011.
- [61] Muzzarelli RAA JC, Gooday GW. Chitin in Nature and Technology. 1986.
- [62] Grégorio Crini P-MBeÉG. chitine et chitosane du biopolymère a l'application .
- [63] El-Zayat EMS. Development of In Situ Gelling Formulations for Per-Oral Sustained Delivery of Dextromethorphan. January 2011(A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for Master's Degree in the Department of Pharmaceutics at College of Pharmacy King Saud University).
- [64] Tarak.J.Mehta MRP, K.R.Patel, N.M.Patel. DESIGN AND DEVELOPMENT OF GASTRORETENTIVE FLOATING TABLETS OF RANITIDINE HCL. Joshi/IJDFR Sep.-Oct. 2011;2(5).
- [65] Raymond C Rowe PJSaMEQ. Handbook of Pharmaceutical Exipients.622.
- [66] Betageri VGKaGV. Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications. Polymers. 2011.
- [67] Mme RBIHAMounia MR. Cours Plan d'expérience 2015.
- [68] GOUPY J. LES PLANS D'EXPERIENCES 2006.
- [69] BOX George.E. P. HWG, HUNTER J. Statistics for Experimenters,deuxième édition. 2005.
- [70] Creighton JGL. introduction au plan d'experience Dunod, Paris, 2001, 2006.
- [71] ABDELKADER MHS. Rhéologie de base. 2013-2014.
- [72] RANA ANMaAC. UV SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF RANITIDINE HYDROCHLORIDE IN PURE AND PHARMACEUTICAL FORMULATION. Int J Chem Sci. 2009.

