

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Sétif 1
Faculté de **Technologie**
Département de **Génie des Procédés**

MEMOIRE DE MASTER

DOMAINE: Sciences et Techniques

FILIÈRE: Génie des Procédés

OPTION: Génie des procédés pharmaceutiques

Thème:

**ELABORATION ET BIOEVALUATION D'UNE NOUVELLE CLASSE D'HYDROGELS
A BASE DE PECTINE/PECTINE OXYDEE MODIFIEES PAR LE CHITOSANE ET/OU
LA GELATINE.**

Présenté Par :

Mlle. Boulahbel Hassina

Encadré Par :

Pr. El Kolli Merbah Meriem

Date de soutenance: 21 Juin 2014

Jury de Soutenance:

Président:	Ouari kamel	Maître de conférences A	US1
Encadreur:	El Kolli Meriem	Professeure	US1
Examineur:	Bouras Karima	Maître de conférences B	US1

Dédicaces

*Je voudrai en premier lieu exprimer ma profonde gratitude à **Dieu** qui m'a donné la force et la patience pour réaliser ce travail.*

*A ma **chère mère**, le plus onéreux diamant de ma vie que le bon **Dieu** m'a offert, source d'amour et de tendresse.*

*A mon **cher père**, qu'aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour lui. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de ses sacrifices qu'il a consenti pour mon éducation et ma formation.*

*A mes chères sœurs : **Manel, Rayene & marwa** pour leurs encouragements.*

*A mon petit frère: **Fadi Eyede**, le porte-bonheur de la maison.*

Aucun mot ne pourra exprimer ma gratitude pour vous mes très chères amies:

Noujoud, Amina, Soraya, Nesrine, Sara, Hadjer, Sabrina & Néjma.

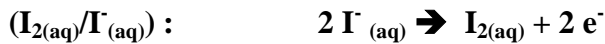
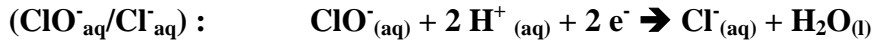
A toute la famille du génie des procédés et spécialement le groupe du génie des procédés pharmaceutiques : 2013/2014.

Partie 1: OXYDATION DE LA PECTINE

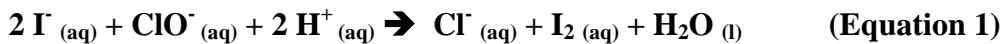
III.1.1. Oxydation par l'hypochlorite de sodium :

III.1.1.1. Titrage indirect de l'eau de Javel :

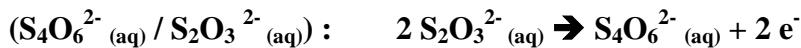
- Les demi-réactions:



- La réaction des ions hypochlorites avec les ions iodures en milieu acide :



- Les demi-réactions:



- La réaction du diiode avec les ions thiosulfates :



- Les caractéristiques des deux transformations elles peuvent : rapides, totales et spécifiques.

A. Quantité de matière $n(\text{I}_2)$ de diiode formé :

On utilise l'équation de la réaction (2)

$$n(\text{I}_2) / 1 = n(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) / 2 \rightarrow n(\text{I}_2) = C_2 \cdot V_{\text{eq}} / 2$$

Application numérique :

Pour une mesure ayant donné $V_{\text{eq}} = 11 \text{ ml}$, on a :

$$n(\text{I}_2) = (1 \cdot 10^{-2} \cdot 11 \cdot 10^{-3}) / 2 \rightarrow n(\text{I}_2) = 5,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$$

A l'équivalence, on consomme la totalité de la quantité $n(\text{I}_2)$ de diiode formé avec la quantité juste nécessaire $n(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})$ d'ions thiosulfates versée. Le mélange réalisé est alors stœchiométrique.

Remarque : on peut retrouver ce résultat à l'aide d'un tableau d'avancement en traduisant qu'à l'équivalence, les quantités de matière de diiode et d'ions thiosulfates versées sont nulles.

B. Quantité de matière $n(\text{ClO}^-)$ d'ions hypochlorites contenus dans la solution :

On suppose que les ions iodures $\text{I}^-_{(\text{aq})}$ contenus dans le volume V_1 de solution S_1 et les ions $\text{H}^+_{(\text{aq})}$ contenus dans la solution d'acide sulfurique, sont en excès par rapport aux ions hypochlorites $\text{ClO}^-_{(\text{aq})}$ de la prise d'essai de solution S .

En déduire la quantité $n(\text{ClO}^-)$ d'ions hypochlorites contenus dans la prise d'essai. On pourra, si on le désire, justifier à l'aide d'un tableau d'avancement.

Tableau III.1.1. Etat d'avancement pour déduire la quantité $n(\text{ClO}^-)$ d'ions hypochlorites contenus dans la prise d'essai.

	2I^-	+	ClO^-	+	2H^+	=	Cl^-	+	I_2	+	H_2O
$t=0$	/		N		/		0		0		/
t_{eq}	/		$n-x_e$		/		x_e		x_e		/
t_f	/		$n-x_f$		/		x_f		x_f		/

Lorsque l'on rajoute des ions iodures en excès, en milieu très acide, à la prise d'essai de solution S , on consomme totalement la quantité $n(\text{ClO}^-)$ d'ions hypochlorites qu'elle contient suivant la réaction totale d'équation (1).

L'écriture de cette réaction montre que la disparition totale de $n(\text{ClO}^-)$ est suivie de l'apparition d'une quantité de matière égale de diiode, car pour 1 mole de $\text{ClO}^-_{(\text{aq})}$ disparue il y a 1 mole $\text{I}_2_{(\text{aq})}$ apparu.

On a donc : $n(\text{ClO}^-) = n(\text{I}_2) = 5,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$

Remarque : on peut retrouver ce résultat en traduisant que dans l'état final, la quantité de matière finale de réactif limitant $\text{ClO}^-_{(\text{aq})}$ est nulle, soit : $n_{\text{finale}} \text{ClO}^-_{(\text{aq})} = n(\text{ClO}^-) - x_f = 0$.

En tenant compte d'autre part que $n(\text{I}_2) = x_f$, on en déduit bien que $n(\text{ClO}^-) = n(\text{I}_2)$.

C. Détermination du degré chlorométrique :

a. Détermination la quantité $n'(\text{ClO}^-)$ d'ions hypochlorites présents dans un volume $V' = 1 \text{ L}$ d'eau de Javel commerciale.

Dans notre prise d'essai de 10 ml, on a $5,5 \cdot 10^{-5}$ moles d'ions $\text{ClO}^-_{(\text{aq})}$. Donc dans 10 ml de solution S , on a $5,5 \cdot 10^{-5} \times 10^2 \text{ mol}$ d'ions $\text{ClO}^-_{(\text{aq})}$, car S a été obtenue en diluant 100 fois. Il en résulte que dans 1 L de solution commerciale, on a la quantité

$$n'(\text{ClO}^-) = 5,5 \cdot 10^{-5} \times 10^2 \times 10^2 = 5,5 \cdot 10^{-1} \text{ moles.}$$

D. Valeur du degré chlorométrique :

La définition du degré chlorométrique repose sur la réaction totale d'équation :



Le degré chlorométrique est le volume $V(\text{Cl}_2)$ de dichlore gazeux, mesuré en litre, dans les conditions normales de pression et de température, qui se dégage lorsque l'on consomme totalement la quantité de matière $n'(\text{ClO}^-) = 5,5 \cdot 10^{-2}$ moles, contenue dans un volume de 1 L de solution commerciale, par un excès d'acide.

On a: $v(\text{Cl}_2) = n(\text{Cl}_2) \times V_m$

$n(\text{Cl}_2) = n'(\text{ClO}^-)$. Donc : $v(\text{Cl}_2) = n'(\text{ClO}^-) \times V_m$

$n(\text{Cl}_2)$: la quantité de matière de dichlore gazeux qui se dégage lorsque $n'(\text{ClO}^-)$ est totalement consommée ; V_m : volume du gaz parfait.

A.N: chl = $5,5 \cdot 10^{-1} \times 22,4$ 12 ° chl

Ce qui est bien conforme à l'étiquette.

III.1.1.2. Teneur en carbonyle et en carboxyle :

Le dosage permet d'obtenir les résultats suivants :

Tableau III.1.2. Résultats du dosage des groupes carbonyles et des groupements carboxyliques.

Concentration du Cl actif (%)	0,25	0,75	1,5	3
Groupements carbonyles (méthode 1)	0,72	0,70	0,64	0,50
Groupements carbonyles (méthode 2)	0,06	0,31	1,23	3,97
Groupements carboxyles	0,40	1,21	1,80	2,25

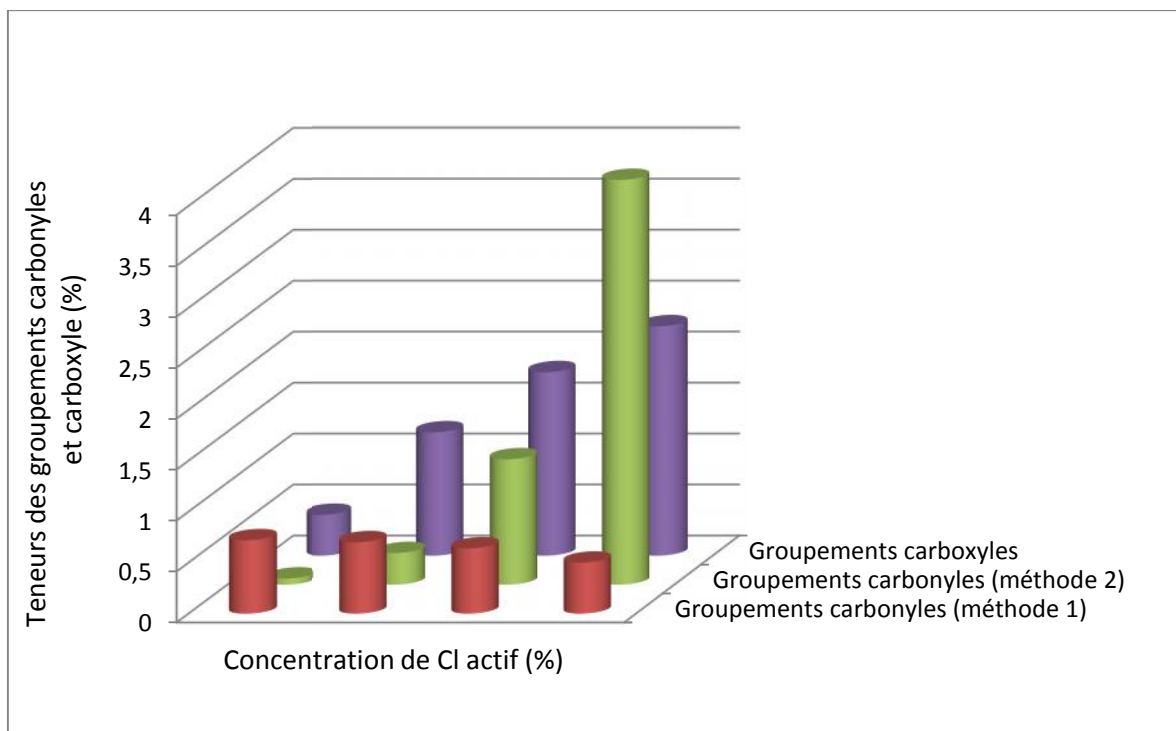


Figure III.1.1. Histogramme résumant les valeurs des teneurs en carbonyles et carboxyles.

D'après le tableau **III.1.2** et la figure **III.1.1**, nous remarquons que la teneur en carbonyle diminue selon la méthode 1 avec la concentration du chlore actif alors qu'elle augmente selon la 2^{ème} méthode aussi bien, celle des carboxyles.

III.1.1.3. Spectroscopie IR-TF :

La **figure III.1.2** illustre les spectres IR-TF de la pectine et des pectines oxydées à différentes concentrations du chlore actif. Des modifications structurales sont observées et de nouveaux groupements fonctionnels chimiques peuvent être identifiés.

L'intensité et la surface de la bande des carboxyles estérifiés à 1842cm^{-1} de la pectine sont plus élevées que ceux pour la pectine oxydée par différents degrés de Cl_2 actif (0,25 ; 0,75 ; 1,5 et 3) (%) mais le pic correspondant au COO^- se déplace de 1613 vers 1652cm^{-1} et.

Aussi, nous observons un léger déplacement du pic à 1742cm^{-1} (carboxyles estérifiés) vers 1746cm^{-1} .

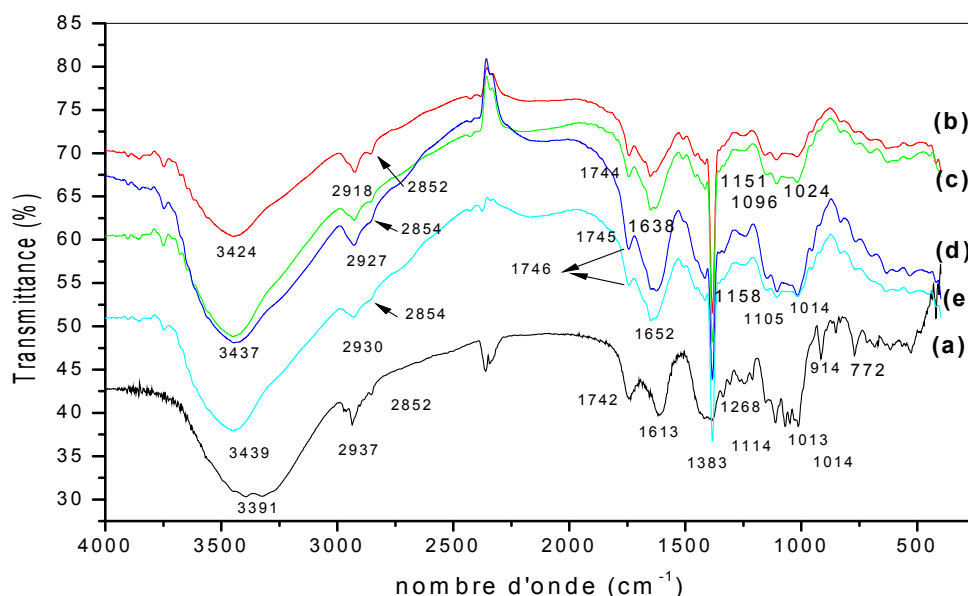


Figure III.1.2. Spectres IR-TF de la pectine (a), pectines oxydées à 0,25% (b), PO à 0,75% (c), PO à 1,5% (d), PO à 3 % (Cl₂ actif) (e).

Par ailleurs, dans la région 1450-1350 cm⁻¹, nous notons l'apparition d'un nouveau pic fin et intense pour la pectine oxydée à 1383 cm⁻¹ associée à l'absorption des carboxyles qui appartient sans doute aux O-H des acides carboxyliques.

Le pic d'absorption à 2937 cm⁻¹ est attribué aux vibrations d'élongation des CH aliphatiques des méthyles. Il subit en effet un déplacement progressif de 2916cm⁻¹ en augmentant la concentration de l'agent oxydant pour atteindre la valeur de 2930 cm⁻¹.

A l'instar des résultats que nous venons d'avoir de donner pour l'interprétation des partie **IR-TF**, trois réactions possibles peuvent surgir suite à l'action de l'hypochlorite sur la pectine. Il y a la transformation des hydroxyles en carbonyles ; l'oxydation des carbonyles en carboxyles et aussi, la dépolymérisation de la pectine.

Nous devons évoquer qu'une étude similaire a été menée par **Redriguez (Redriguez, 2008)** sur la cellulose. Il a été démontré que les attaques sont non sélectives mais les plus plausibles se font en position 1, 2 et 2, 3.

Le schéma des produits susceptibles de se former à partir de la pectine est donné dans la **figure III.1.3.**

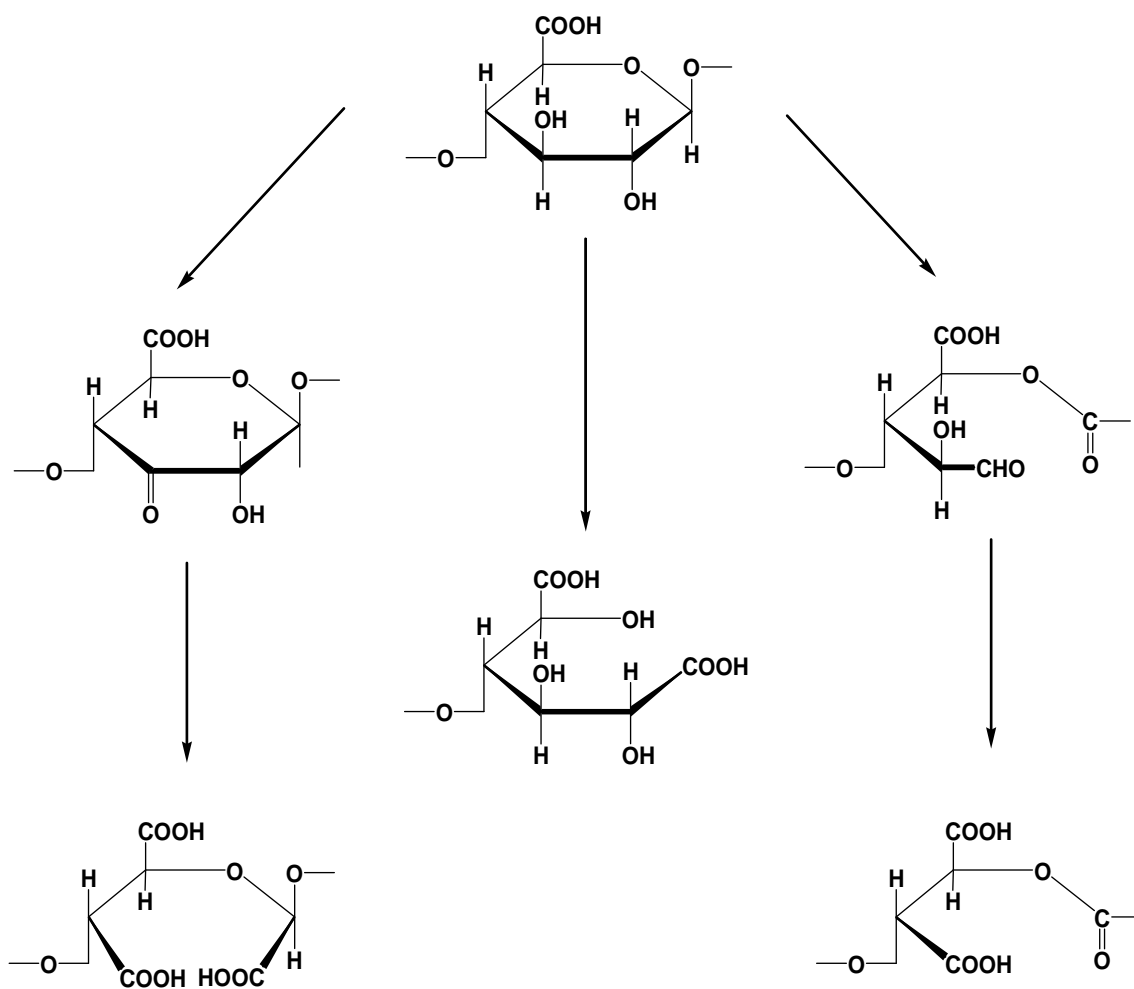


Figure III.1.3. Conversions les plus probables de la pectine suite à son oxydation par l'hypochlorite de sodium.

III.1.2. Oxydation par le periodate de sodium:

III.1.2.1. Teneur en carbonyle et en carboxyle:

L'oxydation de la pectine par le periodate favorise la formation de groupes dialdéhydes, suite à une scission homolytique de la liaison C₂-C₃.

La méthode de dosage par l'hydroxylamine (méthode 1) montre que la teneur en aldehyde évolue faiblement dans la gamme de 2 à 4% alors que pour la seconde méthode de dosage où on utilise l'indicateur coloré, la phénolphthaléine, l'augmentation se fait d'une manière drastique. Elle passe de 5,7% à 34% pour une concentration de NaIO₄ égale à C₁=0,028M, de 11,5 à 69% pour C₂=0,056M et de 11 à 74 pour C₃=0,084M et enfin de 17,3 à 92% pour C₄=0,112M.

Aussi, nous constatons qu'en comparaison avec la méthode où la teneur n'est que de 3% d'une façon générale. L'effet de la concentration de l'agent oxydant influe remarquablement

sur le degré d'oxydation. Nous passons de 5% à une concentration de periodate $C_1=0,028M$ pendant un temps de réaction de 1 h à 92% pour une concentration $C_4= 0,112M$ à $t=4h$ (tableau III.1.2; figure III.1.4).

Par ailleurs, le dosage de carboxyles augmente avec le temps mais diminue avec la concentration à l'exception pour C_2 à $t=1h$ où on a 0,09% alors que pour $t=1heure$ à $C=C_3$ le taux est de 0,13%. Cette augmentation de groupements carboxyles n'est qu'une indication la plus plausible sur la conversion des aldéhydes en carboxyle d'une part. Et d'autre part, il est probable que les réactions d'hydrolyse de la fonction ester portée par la pectine prenne lieu d'où l'atteinte du degré de méthylation et ou encore une dégradation des chaines de pectines.

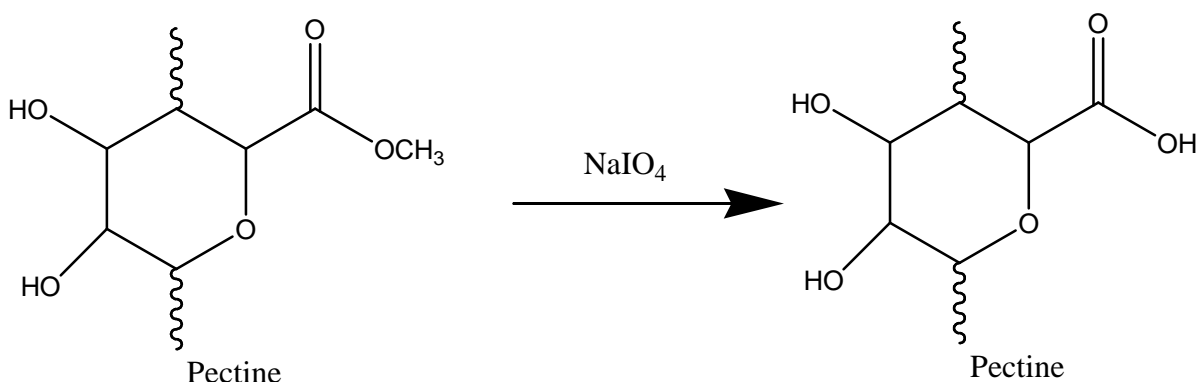


Tableau III.1.3. Résultats du dosage des groupes carbonyles et des groupements carboxyliques.

	Temps (h)	Teneur en carbonyle 1 (%)	Teneur en carbonyle 2 (%)	Teneur en carboxyle (%)
C1	1	3,13	5,76	1,21
	2	3,24	11,53	1,53
	3	3,36	23,06	1,71
	4	3,69	34,06	2,02
C2	1	2,91	11,53	0,09
	2	3,13	23,06	0,54
	3	3,58	40,36	0,90
	4	3,69	69,20	1,12
C3	1	3,24	11,53	0,13
	2	3,47	34,06	0,31
	3	3,69	51,90	0,54
	4	3,92	74,96	0,76
C4	1	3,36	17,30	0,06
	2	3,58	28,83	0,27
	3	3,80	63,43	0,49
	4	4,03	92,26	0,63

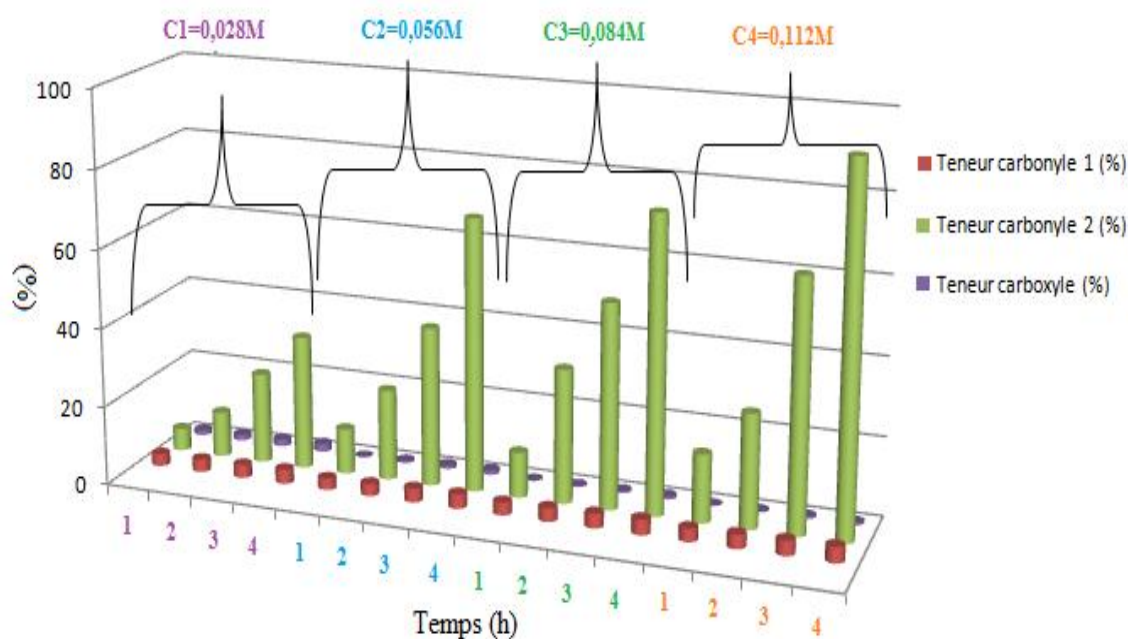


Figure III.1.4. Histogramme résumant les valeurs des teneurs en carbonyles et carboxyles

III.1.2.2. Spectroscopie IR-TF :

La **figure III.1.5** illustre les spectres IR-TF de la pectine et de la pectine oxydée par le periodate de sodium.

Nous avons entrepris une discussion sur les modifications qui sont apparus dans le spectre en nous appuyant sur des références bibliographiques antérieures.

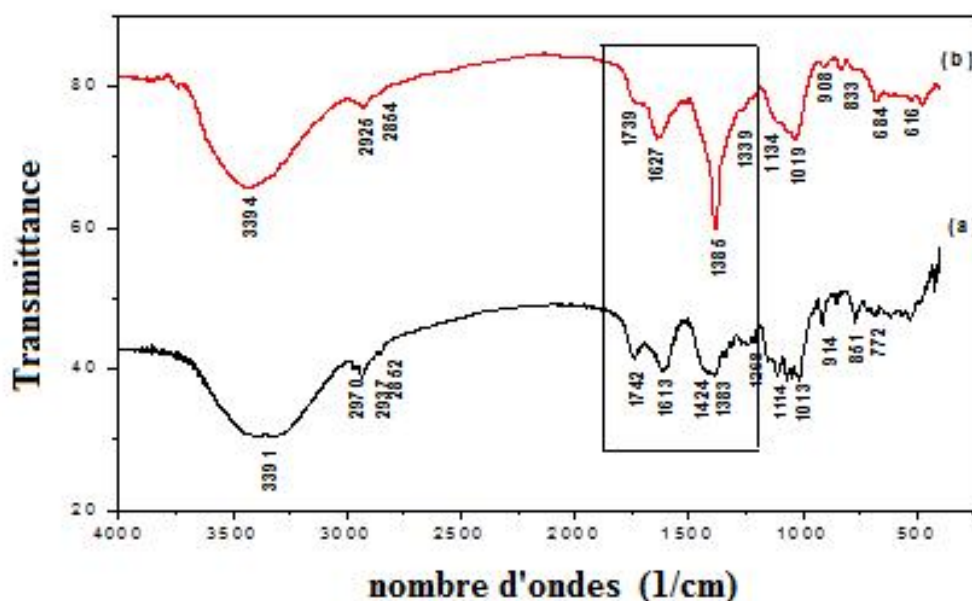


Figure III.1.5. Spectres IR-TF dans le KBr de la pectine (a), la pectine oxydée pendant t=4h (b).

La région entre 1013 et 1114 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation des groupements latéraux C-OH et à la vibration glycosidique C-O-C (**Lin, 2010**). La bande à 914 cm^{-1} représente la vibration de déformation de COO^- (**Synytsya et al., 2003**). Le pic à 1383 cm^{-1} est lié à la vibration de déformation des OH (**Mishra, 2011**).

Le domaine entre 1600 et 1800 cm^{-1} , nous est particulièrement intéressant dans l'identification et la quantification des pectines. Deux bandes à 1613 et 1742 cm^{-1} sont attribuées à des carboxyles libres et estérifiés respectivement (**Chatjigakis et al., 1998**).

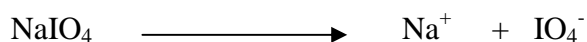
Il a été constaté selon **la figure III.1.5** que le pic correspondant au COO^- qui était plus fin se déplace de 1613 vers 1627 cm^{-1} et devient large ; on observe aussi un déplacement du pic à 1742 cm^{-1} vers 1739 cm^{-1} , ce qui d'après **Chatjigakis et al.**, correspond aussi à des carboxyles estérifiés (**Chatjigakis et al., 1998**). Et de là, nous confirmons que la réaction d'oxydation a bien eu lieu, et que les groupements aldéhydes se sont formés suite à une

oxydation sélective par le periodate des hydroxyles portés par des carbones vicinaux (**selon la figure III.1.6-5**).

Des changements dans la région de 1424 à 1326 cm^{-1} sont associés à l'absorption des aldéhydes aliphatiques ; nous observons précisément à 1385 cm^{-1} la formation d'un nouveau pic aigu, très fin et d'intensité remarquable que nous l'avons assigné inéluctablement à la vibration C-H dans le plan du carbonyle R-C(H)=O.

Un aperçu sur le mécanisme réactionnel de l'oxydation de la pectine par le periodate de sodium est proposé suite à une recherche bibliographique variée. Il est à noter que cet agent, l'anion periodate, favorise la formation d'aldéhydes suite à une scission de la liaison carbone-carbone porteurs des OH (**Krausz et al., 2008**).

Le mécanisme généralement proposé fait intervenir la dissociation du periodate puis l'anion IO_4^- forme un intermédiaire cyclique qui conduit aux aldéhydes.



La réaction donne lieu à un intermédiaire réactionnel ionique de type ester cyclique (**Figure III.1.6**). A ce niveau de réaction, il n'y a pas réduction de l'espèce périodate mais perte d'eau et fixation de l'alcool pinacolique.

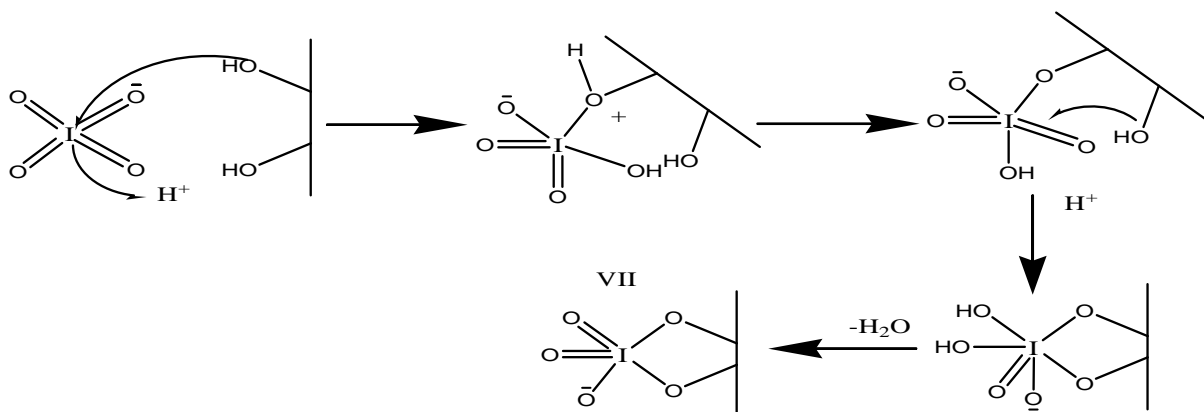


Figure III.1.6. Première étape du mécanisme d'oxydation des alcools pinacoliques par le periodate de sodium (**Jérôme LE ROUX, 2003**).

L'espèce cyclique à 5 chaînons se décompose immédiatement par réarrangement électronique. Le mécanisme concerté conduit à deux réductions successives de l'halogène, le faisant passer du degré d'oxydation VII à V, et à l'oxydation des deux carbones porteurs des fonctions alcools. La particularité de ce mécanisme est qu'il induit une coupure d'une liaison C-C (**figures III.1.7 et III.1.8**).

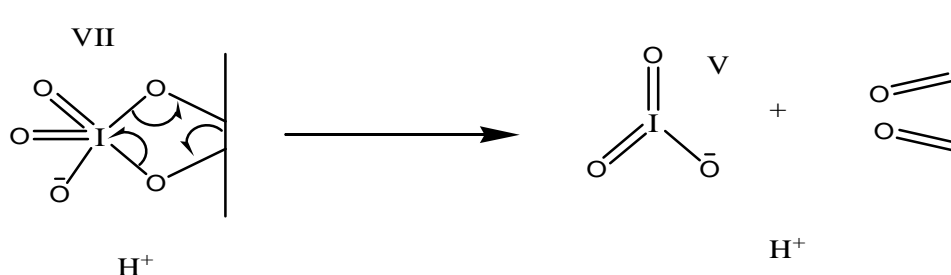


Figure III.1.7. Mécanisme concerté de l'intermédiaire réactionnel cyclique à 5 chaînons.

L'oxydation de la pectine par le periodate est présentée comme suit.

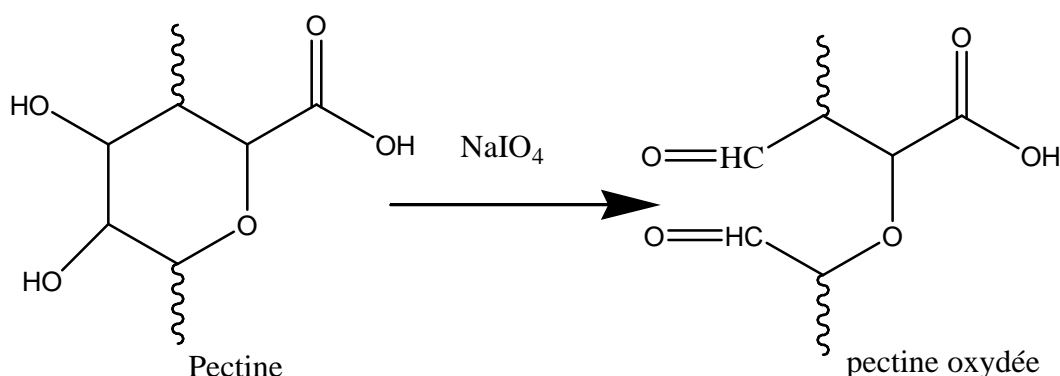


Figure III.1.8. Représentation schématique de l'oxydation de la pectine par le periodate.

Oxydation de diols vicinaux dans le polysaccharide donne des dérivés dialdéhydes avec création d'une chaîne ouverte.

Un pic d'absorption vers 2937 cm^{-1} attribué à la vibration d'élongation du groupe méthyle des esters méthyliques de l'acide galacturonique (**Lin, 2010**) se déplace à 2925 cm^{-1} vers les nombres d'ondes le plus faibles.

Aussi, la bande à 3391 cm^{-1} correspondant à la vibration d'élongation des OH devient moins large et son sommet se déplace vers 3394 cm^{-1} , ce qui probablement indique que le nombre des hydroxyles se réduisent au détriment des carbonyles aldehydiques. Cette dernière remarque ne peut être prise en compte puisque les carbonyles de façon générale sont aptes à former des liaisons hydrogène et de là la vibration d'élongation des OH ne peut être quantifiée.

III.1.3. DRX des pectines avant et après oxydation:

Le diffractogramme de rayons X de la pectine pure montre la présence des pics dont les principaux selon **Manoj et al., (Manoj et al., 2010)** sont à 2 égal à $12,29^\circ$; $18,84^\circ$; $27,3^\circ$ et $40,04^\circ$. Ce qui exhibe clairement sa cristallinité (**Figure III.1.9**).

Pour le POCl l'ajout de l'agent oxydant entraine une modification de la structure cristalline de la pectine qui se traduit par des déplacements des pics à $12,29^\circ$ vers $12,54^\circ$; $18,84^\circ$ vers $20,41^\circ$; $27,3^\circ$ vers $25,85^\circ$ et $40,04^\circ$ vers $30,15^\circ$ respectivement, notons aussi la disparition d'autres pics comme le pic de POCl à $0,25\%$.

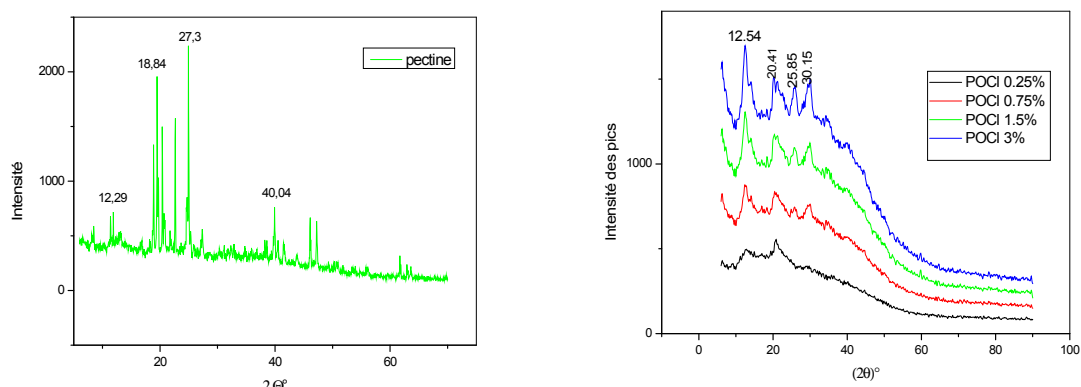


Figure III.9. Diffractogrammes de la pectine et la pectine oxydée (0,25; 0,75; 1,5; 3) (%) du Cl actif.

Pour le POP l'ajout de l'agent oxydant a montré une grande modification de la structure cristalline de la pectine avec déplacement et disparition des pics caractéristiques de cette dernière (**Figure III.1.10**).

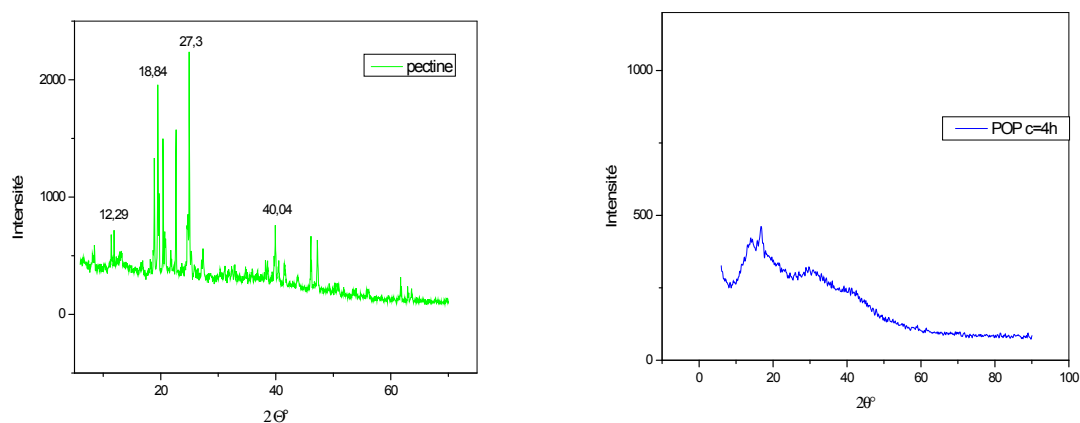


Figure III.10. Diffractogramme de la pectine et la pectine oxydée par le $[KIO_4]$ à $t=4$ h.

Partie 2: Caractérisation des nouveaux matériaux à base de pectine et/ou pectine oxydée additionnées à la gélatine

III.2.1. Degré de réticulation :

La teneur des groupes amino libres dans les hydrogels avant et après réticulation a été déterminée par pH-titration (**Rodrigo *et al.*, 2006** ; **Gómez-Mascaraque *et al.*, 2014**).

Les résultats sont montrés dans la **Figure III.2.1**. Les quantités de NaOH entre le premier et le deuxième point du saut correspondent aux quantités des groupes amino libres. Le pallier entre 25 et 30 ml de NaOH (0,1 N) dans le diagramme indique 36,54 % des groupes amino libres de la lysine trouvée dans la gélatine. La gélatine réticulée soit par le glutaraldéhyde ou les pectines oxydées n'ont pas présenté des quantités de groupes amino importantes, indiquant une réaction complète c.à.d. la consommation des groupes amino libres après réticulation.

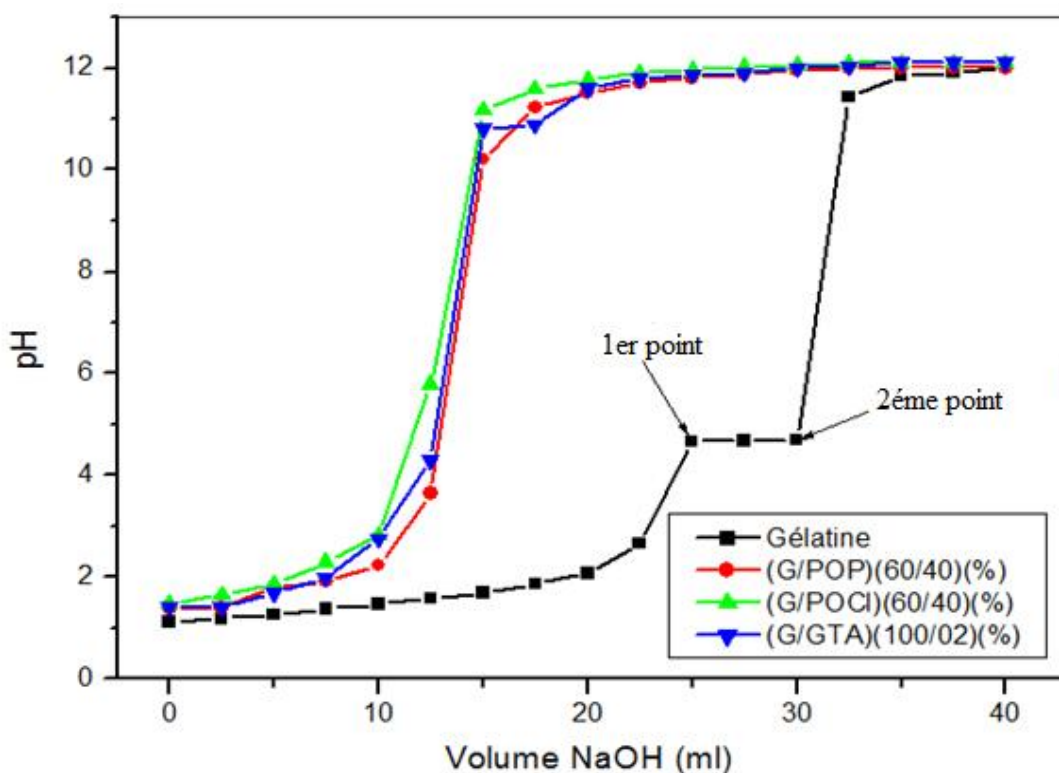


Figure III.2.1. pH titration de gélatine et gélatine réticulée par le glutaraldéhyde ou pectines oxydées.

III.2.2. Détermination du nombre de moles des -amino groupes et évaluation du taux de réticulation par le TNBS :

Cette méthode de dosage des protéines par le TNBS nous a permis de calculer le nombre de -amino groupes (mole/g de gélatine) et d'évaluer le taux de réticulation des différentes gélatines grâce à l'équation qui relie le degré de réticulation à l'absorbance.

Il a été reporté selon **Ofner et al. (Ofner et al., 1992)**, qu'en se servant de cette méthode de dosage, la gélatine peut contenir un nombre de moles de -amino groupes pouvant varier selon le type de gélatine utilisé. Par exemple, pour une gélatine de poids moléculaire $100\,000\text{ g mole}^{-1}$, le nombre des -amino groupes est de 33.10^{-5} moles/g de gélatine. C'est l'équivalent de 33 moles d' -amino groupes provenant essentiellement de la lysine et de l'hydroxylysine (**Ofner et al., 1992**).

Les valeurs du nombre de moles des -amino groupes ainsi que celles des degrés de réticulation des différents films sont donnés dans le **tableau. III.2.1** et **figure III.2.2**.

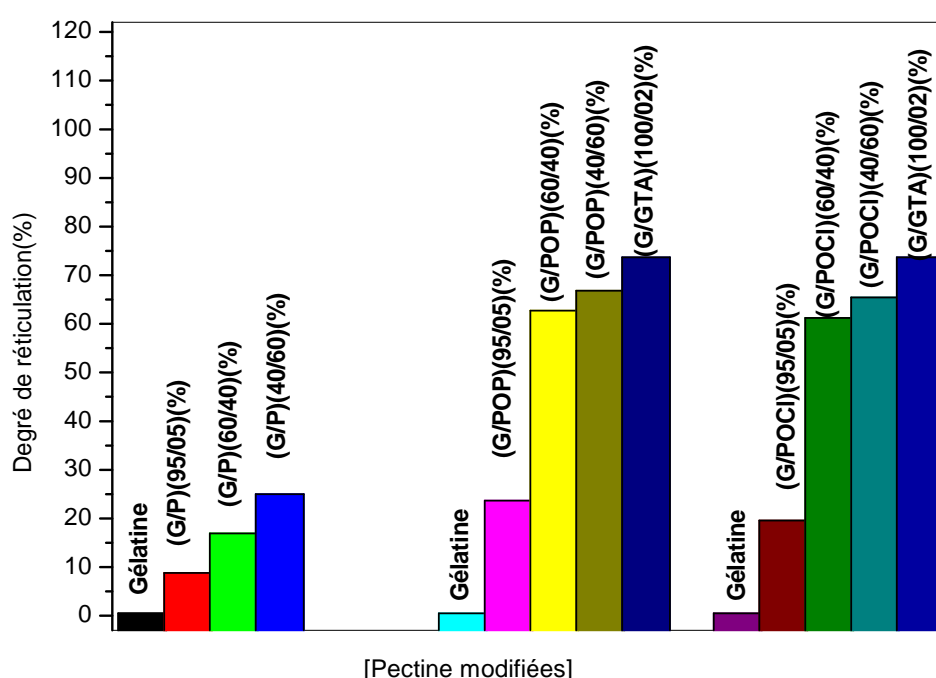


Figure III.2.2. : Histogramme représentant le degré de réticulation de différentes formulations.

Tableau III.2.1. . Tableau représentant le nombre de moles des -amino groupes et les degrés de réticulation des différents films.

Composition	-amino groupes (mole/gramme de gélatine) x 10^5	Degré de Réticulation (%)
Gélatine	36,86	00,00
(G/P)(95/05)(%)	33,62	8,78
(G/P)(60/40)(%)	30,63	16,89
(G/P)(40/60)(%)	27,64	25,00

(G/POP)(95/05)(%)	28,14	23,64
(G/POP)(60/40)(%)	13,74	62,70
(G/POP)(40/60)(%)	12,22	66,82
(G/POCI)(95/05)(%)	29,63	19,59
(G/POCI)(60/40)(%)	14,29	61,21
(G/POCI)(40/60)(%)	12,75	65,40
(G/GTA)(100/02)(%)	09,71	73,64

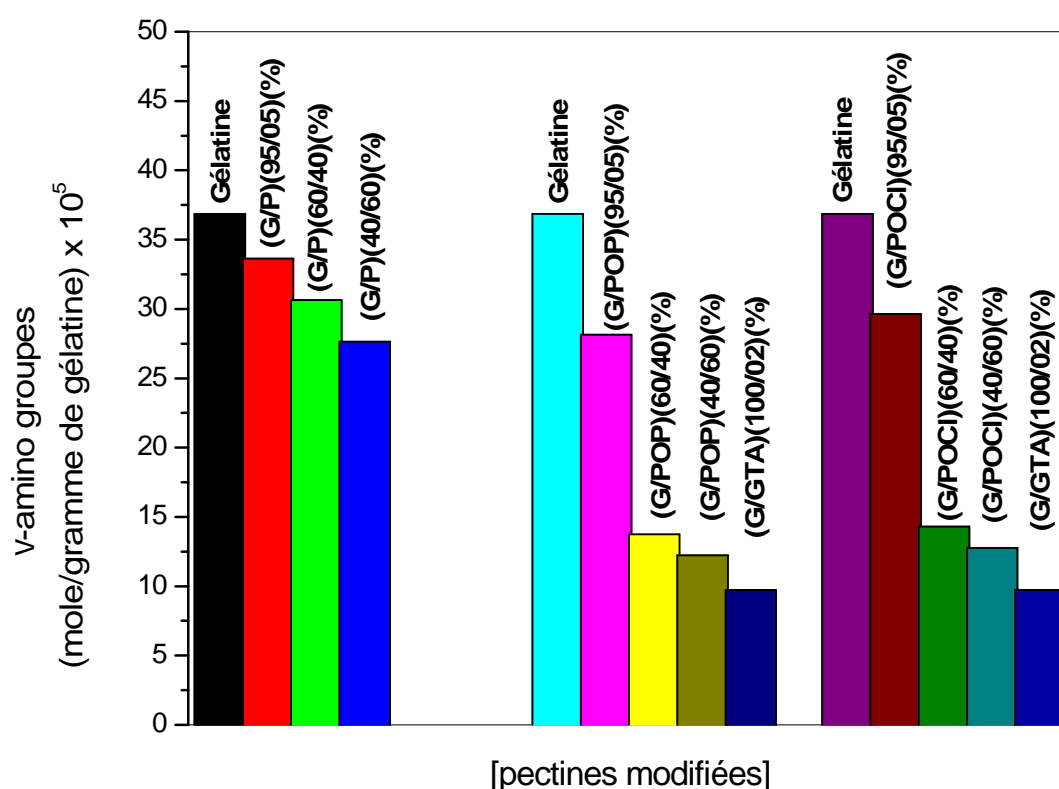


Figure III.2.3. Histogramme représentant -amino groupes (mole/gramme de gélatine) de différentes formulations.

Le nombre des -amino groupes diminue de manière générale en présence des différentes pectines natives ou oxydée voire aussi après réticulation par le glutaraldehyde (**tableau. III. 2.1.**). Par conséquent, le taux de réticulation se trouve augmenter jusqu'à 73,64 %, 66,82% pour une concentration de 2% en glutaraldéhyde et (G/POP)(40/60)(%), respectivement. Ce qui confirme que la réaction de condensation a été bien faite.

La diminution des -amino groupes peut être expliquée à l'échelle moléculaire comme suit :

Les amines primaires et secondaires qui composent la gélatine, en raison de leur caractère nucléophile, peuvent s'additionner sur la double liaison C=O des aldéhydes pour donner un aminoalcool. Si l'amine est primaire, ce qui assurera la présence d'un atome d'hydrogène sur l'azote de l' aminoalcool. Celui-ci se déshydrate spontanément pour former une imine qu'on appelle « base de Schiff» (Arnaud, 2004).

Cette base de Schiff formée va à son tour réagir avec un autre $-NH_2$ d'une autre molécule de gélatine pour donner de la gélatine réticulée (Arnaud, 2004).

III.2.3. Dosage des protéines par l'acide Bicinchoninique (BCA):

D'après les valeurs présentées dans le **tableau III.2.2.**, on observe que la quantité de la protéine libérée dans le cas de la gélatine seule est plus grande par rapport aux autres et elle augmente avec le temps. La quantité des protéines libérées dans le cas de la gélatine réticulée par le glutaraldehyde est presque équivalente par rapport à celle qui est réticulée par les pectines oxydées. Cela, confirme la réaction de réticulation (Boanini *et al.*, 2010).

Tableau III.2.2. Estimation de la concentration de protéines libérées en fonction du temps.

Composition	Temps (min)					
	10	30	60	120	180	240
(G/P)(100/0)(%)	1313,91	1325,58	1379,75	1610,58	2424,75	2425,20
(G/P) (95/05)(%)	555,58	567,25	618,91	816,41	1127,20	1130,30
(G/P) (60/40)(%)	518,91	537,15	611,41	789,25	1098,41	1100,24
(G/P) (40/60)(%)	446,41	479,75	583,91	737,25	1081,08	1081,08
(G/POP) (95/05)(%)	521,41	523,70	598,41	786,41	999,25	999,70
(G/POP) (60/40)(%)	487,08	492,75	538,91	560,13	598,08	598,10
(G/POP) (40/60)(%)	482,17	484,41	493,91	512,75	523,91	524,00
(G/POCl) (95/05)(%)	548,14	559,01	589,32	768,41	1072,25	1073,74
(G/POCl) (60/40)(%)	489,80	492,70	511,91	522,11	678,08	679,31
(G/POCl) (40/60)(%)	484,40	487,41	506,30	510,85	567,10	568,39
(G/GTA)(100/02)(%)	456,39	459,11	487,11	521,40	523,70	525,21

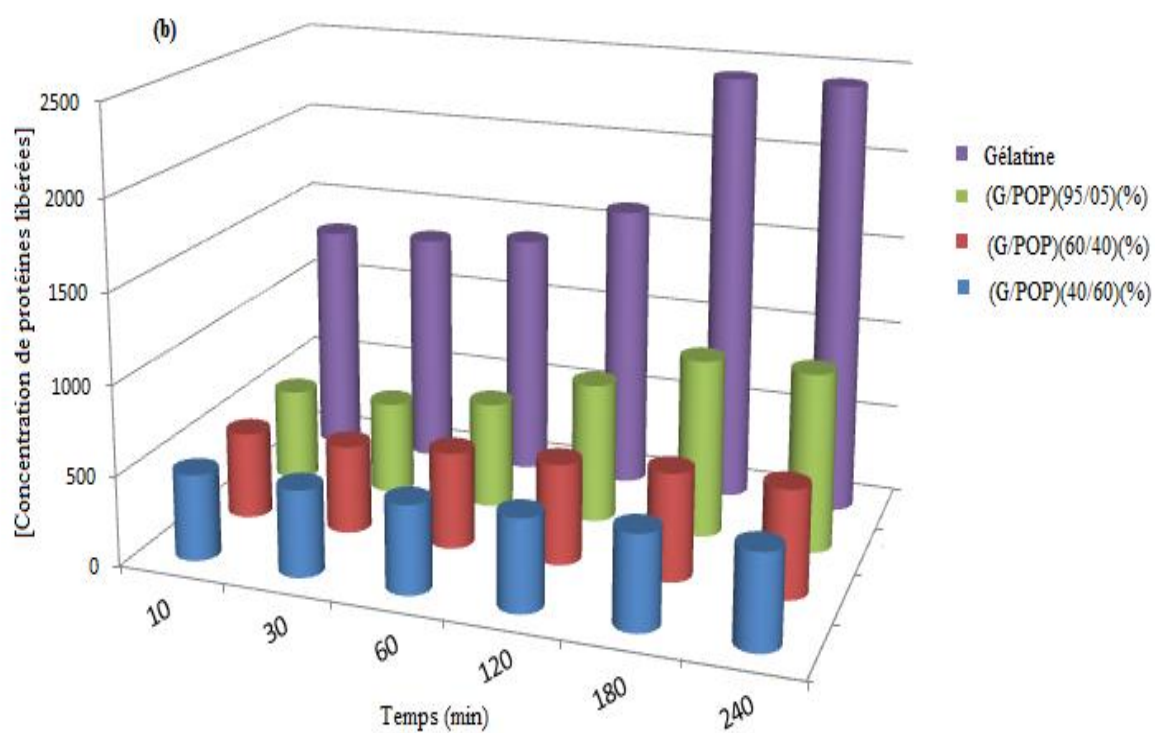
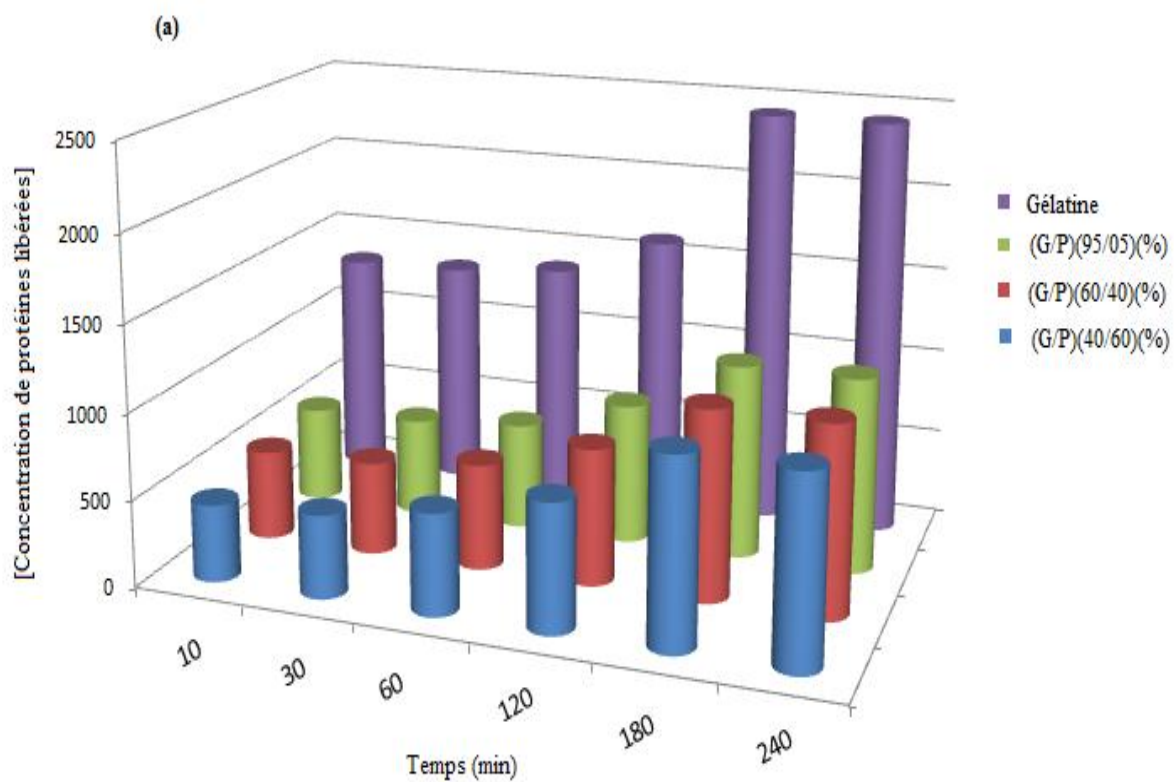


Figure III.2.4. La concentration de protéines libérées en fonction du temps (voir suite).

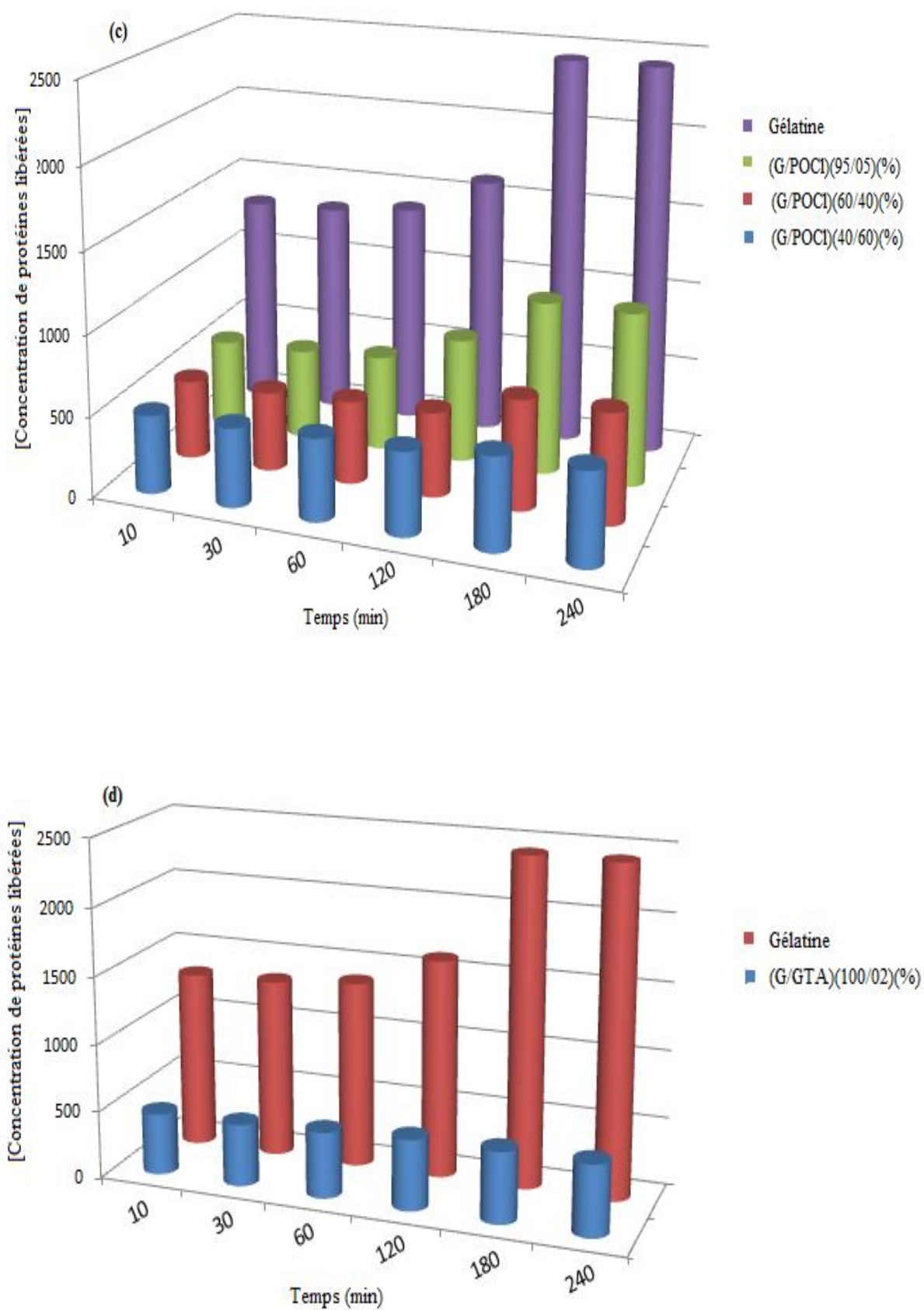


Figure III.2.4. La concentration de protéines libérées en fonction du temps (suite).

III.2.4. Spectroscopie IR-TF :

Au départ, il nous a semblé judicieux d'aborder la gélatine par spectroscopie IR car suite à son addition avant ou après oxydation de la pectine et/ou au glutaraldehyde. Sa structure versatile peut donner naissance à de nouveaux matériaux que nous tenterons de comprendre.

➤ **Gélatine :**

La gélatine présente plusieurs bandes d'absorptions qui peuvent être résumées comme suit:

Deux régions d'absorption à 3395 et 3323cm^{-1} qui correspondent respectivement aux vibrations de valence des OH et des NH.

Il existe aussi, selon **Centeno et al. (Centeno et al., 2004)**, deux zones bien spécifiques:

-Une première à environ 1650cm^{-1} qui représente le carbonyle C=O de l'amide primaire avec la contribution de vibration d'élongation C-N et de déformation CCN.

-Une deuxième à 1546cm^{-1} de l'amide II correspondant à l'élongation C-N et à sa déformation dans le plan, d'une part.

D'autre part, selon une étude exhaustive menée par **Yakimet et al., (Yakimet et al., 2005)**, la triple hélice de la molécule mère qui est le collagène absorbe à 1660 cm^{-1} et l'hélice s'étend en général de 1650 à 1640 cm^{-1} .

Il a aussi été trouvé que quand le taux d'hélice augmente, il peut atteindre 1661 cm^{-1} alors qu'en solution, la gélatine perd son degré d'ordre qui est représenté par le taux en triple hélice. La bande d'absorption correspondante baissera jusqu'à 1643cm^{-1} . Par contre, la région de l'amide secondaire peut augmenter jusqu'à 1560 cm^{-1} et diminuer jusqu'à 1500cm^{-1} . Cette dernière bande est moins sensible à la structure secondaire de l'amide I.

- Il a été reporté par **Pal et al., (Pal et al., 2007)** que la vibration de déformation de N-H ou bien la vibration d'élongation et de déformation dans le plan de l'amide secondaire apparaît entre 1550 et 1500cm^{-1} .

L'apparition des deux bandes à 1650 et 1546 cm^{-1} confirme ce qui a été décrit dans la littérature (**Figure III.2.4**).

La bande à 3073 cm^{-1} de faible intensité nous confirme la présence de C-H_{aromatiques}. Il apparaît également deux pics d'absorption d'intensités moyennes à 2942 et 2880cm^{-1} des C-H_{aliphatiques} asymétriques et symétriques respectivement.

Par ailleurs, les vibrations de déformation de ces derniers groupements sont à 1451 et 1405 cm^{-1} . Le pic à 1073 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation C-O. La région de la bande de l'amide III apparaît entre 1203 et 1243 cm^{-1} .

À 658 cm^{-1} , correspondent les vibrations de balancement des N-H (voir **figure III.2.4**).

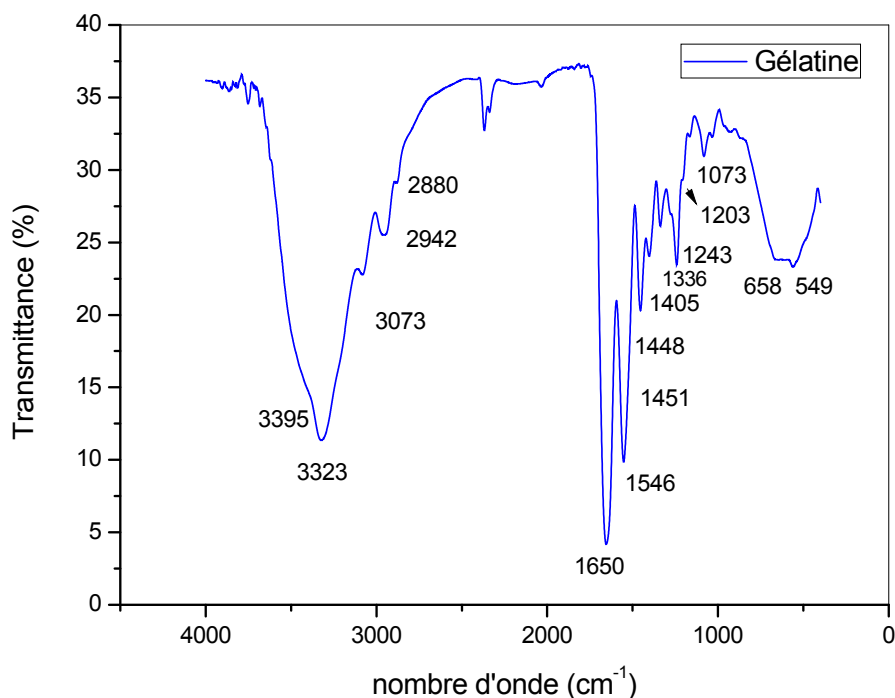
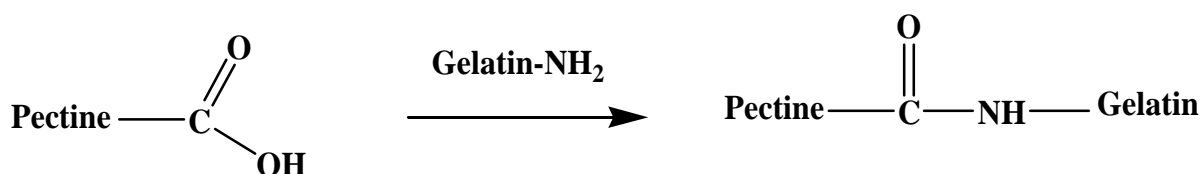


Figure III.2.5. Spectre IR-TF du film de la gélatine.

➤ **Mélange gélatine/pectine (60/40) (%) :**

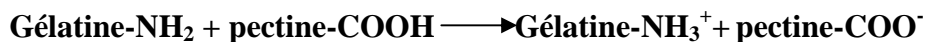
L'ajout de la gélatine à la pectine a visiblement atteint la structure du polysaccharide et vice versa (**Figure III.2.5.b**). Nous avons une diminution de l'intensité du pic des carboxyles méthylés ($-\text{COOCH}_3$) qui devient presque invisible et une augmentation de l'intensité des pics à 1650 et 2942 cm^{-1} .

Ce qui, à 1650 cm^{-1} , nous rend compte de la vibration de déformation des N-H (amide II) et d'élongation des C-N de la gélatine. Nous observons aussi des changements dans la région s'étendant entre 1451 et 1243 cm^{-1} , ce qui est attribué selon **Munarin et al.**, (**Munarin et al.**, **2012**) aux absorptions des amides primaires et secondaires des protéines.



Amidation entre la gélatine et la pectine.

Selon les liaisons que nous disposons et la disparité des travaux menés jusqu'à ce jour, il y a la possibilité d'avoir avant l'oxydation de la pectine des interactions tout simplement physiques entre les charges positives qui proviennent de la gélatine (Gel-NH_3^+) et les charges négatives de la pectine (pectine-COO^-).



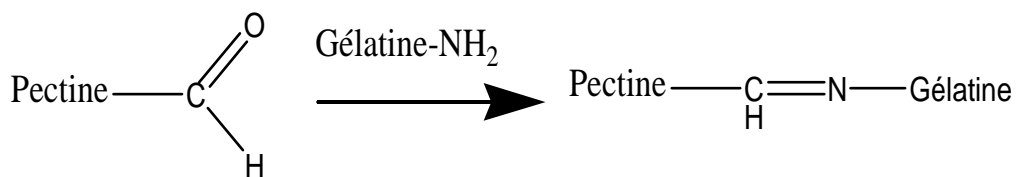
Interaction physique entre la gélatine et la pectine.

➤ **Gélatine réticulée par les pectines oxydées et/ou le glutaraldehyde :**

Dans le cas de la gélatine additionnée à la pectine oxydée (POP), nous avons de nouvelles liaisons qui résultent de la condensation de l'amine de la gélatine et le carbonyle de l'aldéhyde de la pectine oxydée.

D'après la **figure III.2.6.c**, nous avons la disparition des pics à 1739 et 1339 cm^{-1} et une intensification du pic à 1660cm^{-1} . Ce qui nous persuade qu'il y a formation de la base de schiff ($-\text{C}=\text{N}$).

La réaction entre la gélatine et la pectine oxydée (POP) peut être schématisée comme suit :



Réaction de la gélatine avec la pectine oxydée par le periodate.

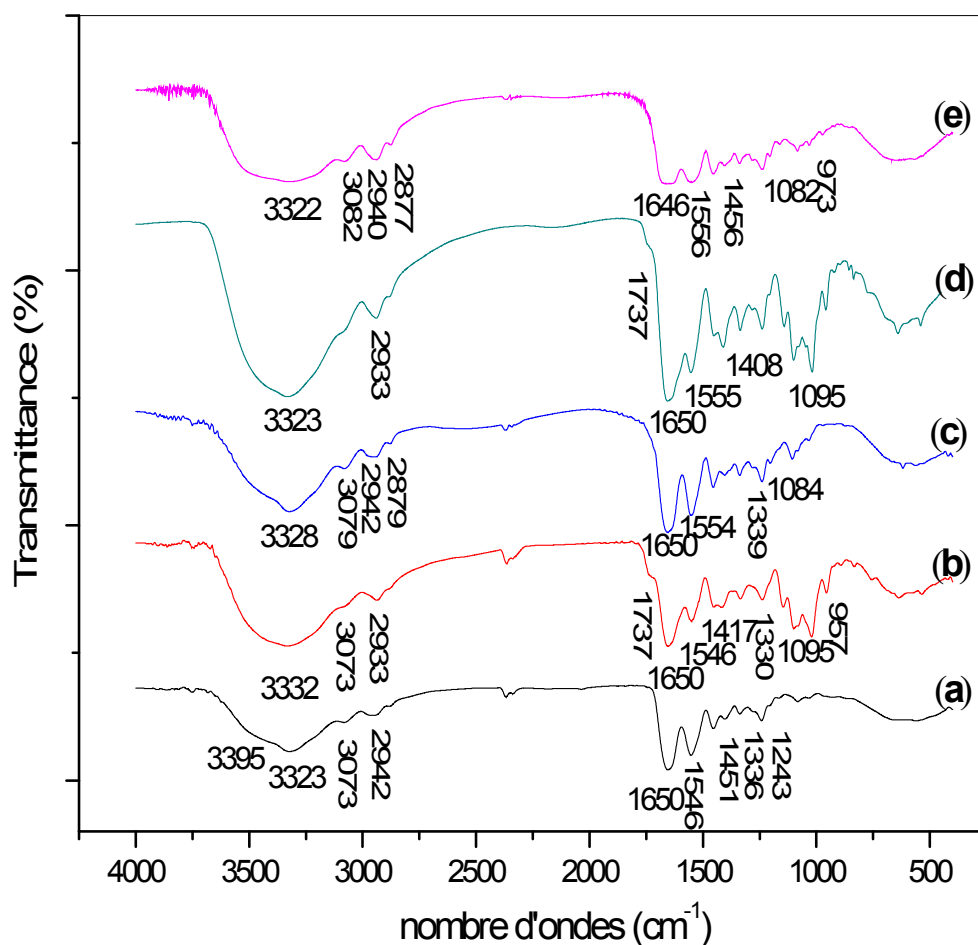
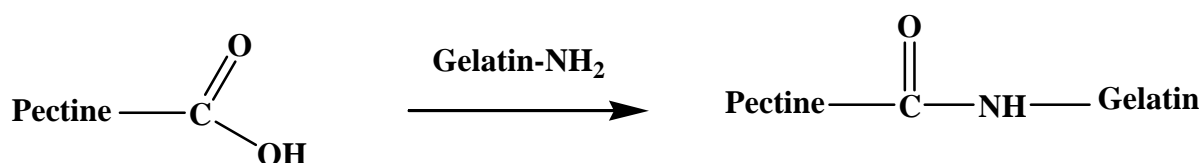


Figure III.2.6. Spectres IR-TF des films de **a)** gélatine, **b)** (G/P) (60/40)(%), **c)** (G/POP) (60/40)(%), **d)** (G/POCl) (60/40)(%) et **e)** (G/GTA)(100/02)(%).

Si on compare entre le spectre de la gélatine et celui de la gélatine réticulée par la pectine oxydée par le chlore (**Figure III.2.6.d**), on trouve qu'ils sont complètement distincts. Nous avons la diminution de l'intensité du pic à 1746 cm^{-1} dans le spectre G/POCl, la disparition de celui à 1336 cm^{-1} et l'intensification du pic à 1650 cm^{-1} . Ce qui nous fait penser qu'il ya une possibilité de la réaction de transamidation de la pectine.



Réaction de la gélatine avec la pectine oxydée par le chlore.

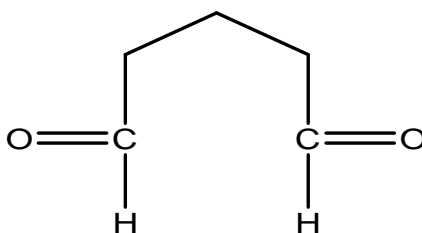
Alors que la réticulation de la gélatine par le glutaraldehyde entraine des augmentations des intensités des pics correspondant aux C-H_{aliphatiques} (**Figure III.2.6.e**).

Il est à rappeler que les C-H_{aliphatiques} du GTA apparaissent à 2960 et 2878 cm⁻¹ respectivement pour C-H_{asy} et C-H_{sym}, alors que le C=O de l'aldehyde du GTA est à 1716 cm⁻¹ (**SDBS data base, annexe**).

Le glutaraldehyde est une molécule qui change réversiblement ou irréversiblement de structure en solution (**Migneault et al., 2004**). Un aperçu sur son comportement est donné comme suit :

Le glutaraldehyde est l'agent de réticulation des protéines le plus utilisé: c'est un tannant, un immobilisant d'enzyme...etc. Il faut souligner que sa simple structure n'est pas indicative de la complexité de son comportement en solution aqueuse et de sa réactivité.

Il est intéressant de comprendre cette dernière pour d'éventuels usages ultérieurs. Il a fait l'objet d'une étude exhaustive. En effet, sa structure en solution aqueuse n'est pas seulement limitée à la forme monomérique qui est:



Un schéma général résume ses formes moléculaires possibles (**Figure III.2.7**).

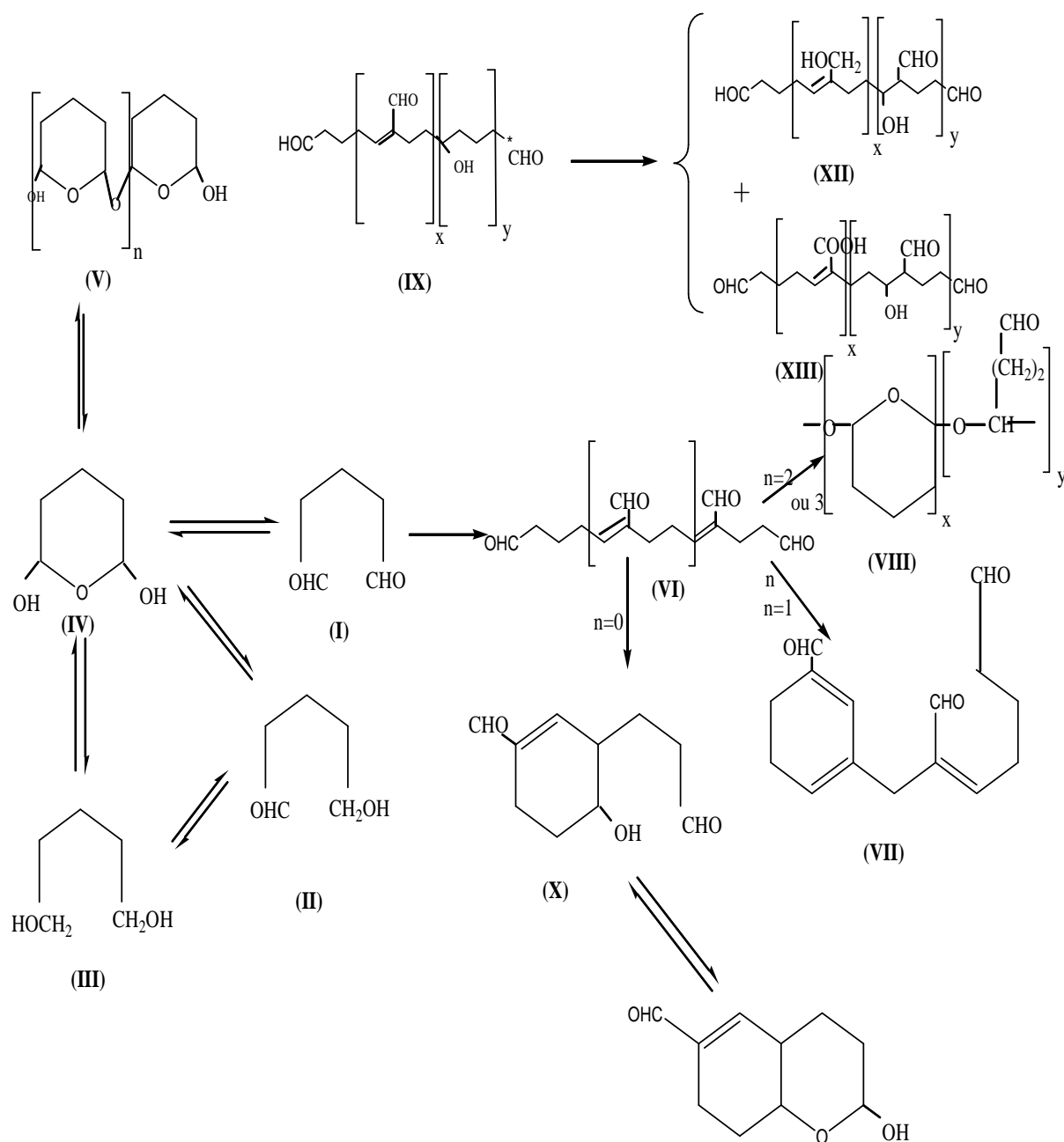


Figure III.2.7. Modifications structurales possibles du glutaraldéhyde en fonction du pH (Migneault *et al.*, 2004).

Des travaux menés par Farris *et al.*, (2010) élucident le processus de réticulation selon les différents pH et confirment que :

- 1- À un pH = 11, le mécanisme de la réaction entre la lysine et les groupes carbonyles du glutaraldéhyde conduit à la formation de la base de schiff (voir Figure III.2.7)

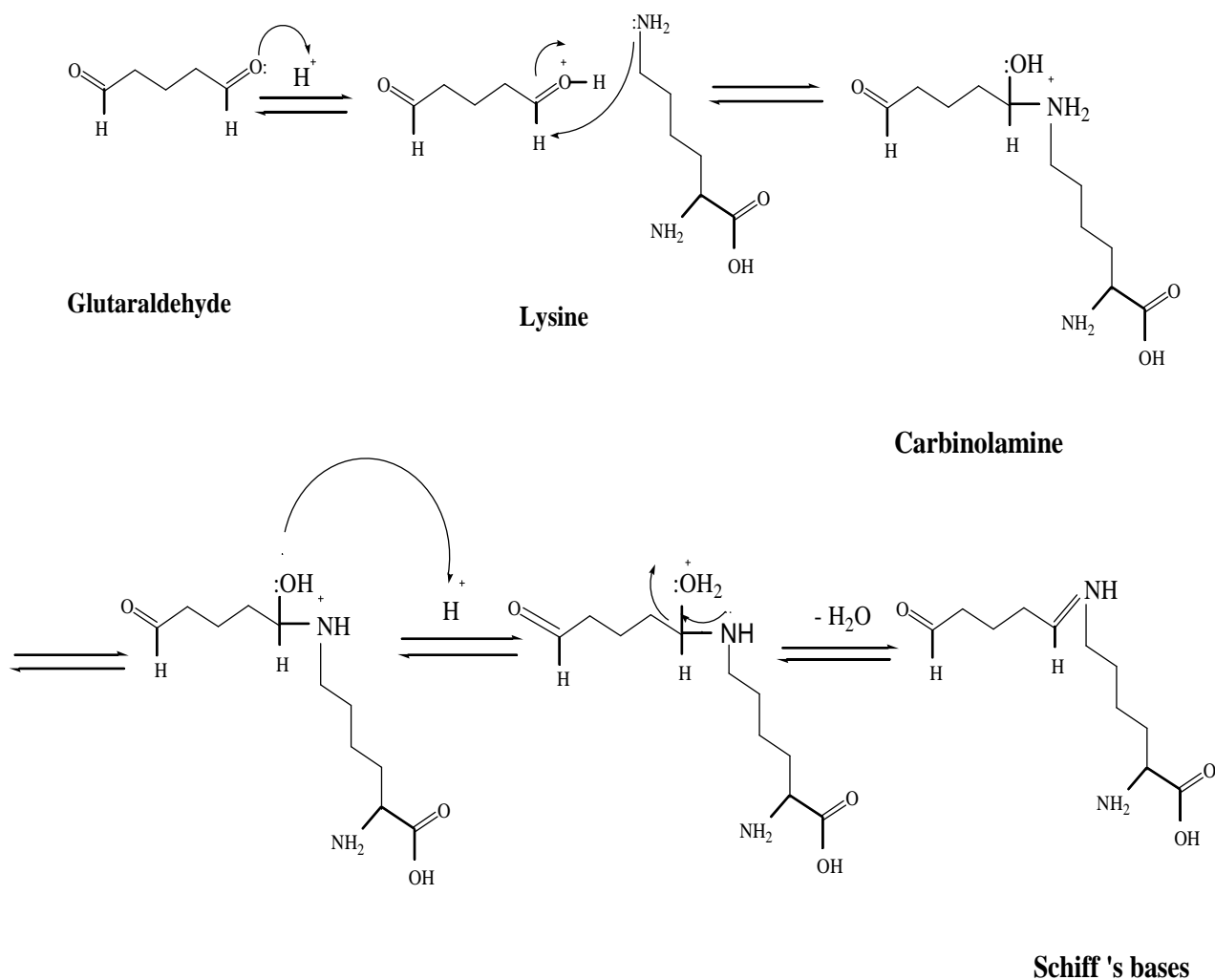


Figure III.2.8. Mécanisme réactionnel entre les amino groupes du GTA pour former la base de Schiff.

2- Il a aussi été proposé que le mécanisme réactionnel de la réticulation entre la gélatine par le glutaraldehyde à un pH acide égale 4,5 mène à la formation d'un hémiacetal alors qu'à un pH acide ($<4,5$), aucune réticulation n'est détectée. La base de schiff, à ce pH, est instable. Elle libère l'amine et le glutaraldehyde.

Dans notre cas, le spectre IR de la gélatine réticulée exhibe une intensification du pic à 1650 cm^{-1} qui était déjà fin et fort devient après réticulation plus fort et large et couvre la région de 1656 à 1633 cm^{-1} . Ce qui correspond probablement à la formation de l'imine «base de schiff». Aussi, le pic à 1456 correspondant au ν_{C-N} «vibration de déformation de C-N» s'intensifie avec la réticulation. Une apparition d'un nouveau pic à 973 cm^{-1} qui correspond au $-OH$ «vibration de déformation» (voir figure III.2.6.d). Les spectres de la gélatine réticulée par la pectine oxydée par le periodate et le glutaraldehyde sont presque identiques.

III.2.5. Diffraction des rayons X:

Selon les différents travaux menés par **Miyasaka *et al.*, (Miyasaka *et al.*, 1996)**, l'analyse par diffraction des rayons X a permis de quantifier la structure cristalline en triple hélice du collagène et notamment de la gélatine dénaturée.

Il a été précisé qu'au niveau des diffractogrammes correspondants, les deux pics caractéristiques aux angles 2θ à environ $7,59^\circ$ (avec la distance inter-réticulaire d_{101} ; $11,63 \text{ \AA}$) et à $17,02^\circ$ jusqu'à $30,78^\circ$ (d_{101} ; $5,20\text{-}2,90 \text{ \AA}$) sont directement attribués à la structure cristalline de la protéine. En outre, une étude réalisée par **Bigi *et al.*, (Bigi *et al.*, 2004)** a montré que le pic de diffraction qui apparaît aux valeurs de 2θ égale à environ de 8° est lié directement au diamètre de la triple hélice et que son intensité est associée au taux de cette dernière.

Il a aussi été démontré que l'addition d'additifs qui sont en général, des polyols tels que le tannin (**Peña *et al.*, 2010**), le glycérol (**Rivero *et al.*, 2009**) affecte le plus souvent par une diminution l'intensité du premier pic à 8° , d'une part.

D'autre part, d'après **Yakimets *et al.*, (Yakimets *et al.*, 2005)**, le premier pic de la gélatine correspond à une teneur de 13% du taux en triple hélice. Ce qui va nous servir de référence pour nos calculs.

L'addition de la pectine native induit une baisse fixe du premier angle de diffraction qui était à $7,59^\circ$ dans le cas de la gélatine seules, à $2\theta = 7,87^\circ$ correspondant ainsi à une diminution du diamètre inter réticulaire de la triple hélice.

Aussi, l'intensité des pics qui sont directement liée aux taux de triple hélice baisse au fur et à mesure que la quantité de la pectine augmente (**Figure III.2.9**).

En accord avec **Langmaier *et al.*, (Langmaier *et al.*, 2008)** et **Rivero *et al.*, (Rivero *et al.*, 2009)**, ce phénomène de changement structural et de diminution de cristallinité sont attribués à l'interaction entre les deux biopolymères.

L'ajout de la pectine oxydée par le chlore provoque l'augmentation de l'intensité du pic à $2\theta = 7,59^\circ$ et par conséquent, le taux de la triple hélice sans que la valeur de 2θ ne soit atteinte (**Figure III.2.9 et tableau III.2.3**). Par contre dans le cas de l'ajout de la pectine oxydée par le periodate, la teneur en triple hélice diminue avec déplacement du premier pic à une valeur de $2\theta=8,95^\circ$.

Si on compare entre le mélange [(G/P), (G/POCl) et (G/POP)] (60/40) (%), on remarque que les pics qui ont été déjà trouvés dans la pectine oxydée apparaissent dans le cas du

mélange (G/POP) et (G/POCl) avec une faible intensité alors que dans (G/P), on ne trouve aucune modification (**Figure III.2.9**).

Tableau III.2.3 Diamètre inter-réticulaire et la teneur en triple hélice de la gélatine, (G/P) (60/40) (%), (G/POCl) (60/40) (%) et (G/POP) (60/40) (%).

Composition	2θ (°)	d (Å)	Teneur en triple hélice (%)
Gélatine	7,59	11,63	18,09
	17,02	5,20	-
	30,78	2,90	-
	41,02	2,19	-
(G/P) (60/40)(%)	7,87	11,22	14,19
	16,23	5,45	-
	29,7	3	-
	41,56	2,17	-
(G/POCl) (60/40)(%)	7,59	11,63	19,34
	12,7	6,96	
	16,77	5,28	
	22,14	4,01	
	30,78	2,90	
	42,64	2,11	
(G/POP) (60/40)(%)	8,95	9,87	13,87
	15,64	5,66	
	30,84	2,89	
	41,59	2,16	

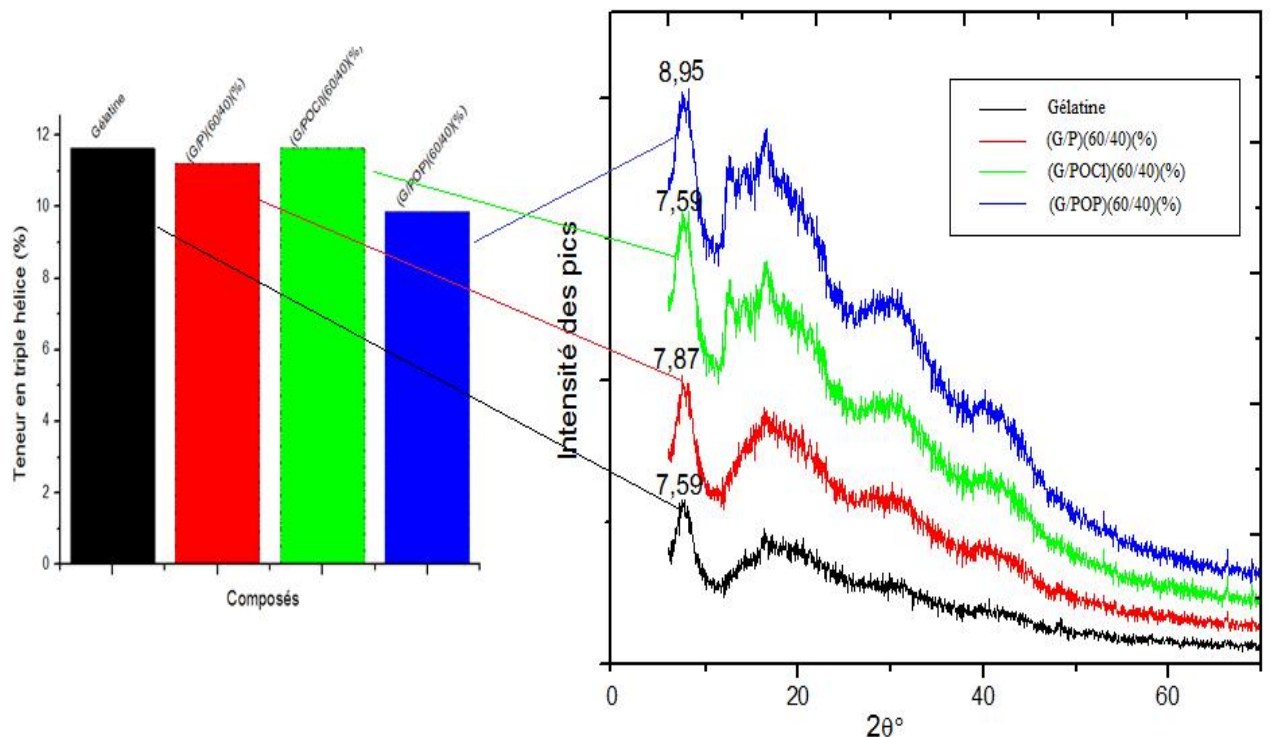


Figure III.2.9. Diffractogrammes de la gélatine, (G/P) (60/40) (%), (G/POCl) (60/40) (%) et (G/POP) (60/40) (%).

III.2.6. Test de gonflement :

La mesure du taux de gonflement a été faite avec variation du ratio de la gélatine par rapport à la pectine et les pectines oxydées à une température ambiante. Tous les résultats obtenus du rapport de gonflement à l'équilibre pendant 4 heures sont donnés dans le **tableau III.2.4**.

Il ressort à partir des résultats obtenus que :

- 1- En absence des pectines, la gélatine est la plus gonflante ;
- 2- Quand la pectine non oxydée est introduite à la gélatine, le G_{\max} diminue et cela s'accorde avec les travaux de **Farris *et al.*, (Farris *et al.*, 2010)**;
- 3- L'ajout de la pectine oxydée entraîne par contre, une diminution remarquable.
- 4- La gélatine réticulée par la pectine oxydée par le periodate et le chlore a un taux de gonflement comparable à celui de la gélatine qui est réticulée par le glutaraldehyde ce qui confirme la réaction de réticulation.

Les courbes des tests de gonflements :

Les courbes des tests de gonflement sont données dans la **Figure III.2.10-15**, Elles montrent l'existence de trois zones à savoir: absorption, libération, saturation.

Tableau III.2.4. Valeurs des G_{\max} des différentes compositions des films de gélatine, (gélatine /pectine) et (gélatine /pectines oxydées).

Milieux Composition	Taux de gonflement (%)		
	Eau distillée	pH = 7,4	pH = 8,2
(G/P)(100/0) (%)	1796,25	2202,50	2655,62
(G/P)(95/05) (%)	1522,87	1966,25	2524,25
(G/P)(60/40) (%)	985,62	1715,00	2315,12
(G/P)(40/60) (%)	1078,87	1603,75	2500,62
(G/POP)(95/05) (%)	938,50	1432,62	2149,75
(G/POP)(60/40) (%)	400,00	1215,37	1647,62
(G/POP)(40/60) (%)	635,12	1187,62	1807,87
(G/POCl)(95/05) (%)	634,25	1157,75	1654,50
(G/POCl)(60/40) (%)	1020,50	1840,62	2405,37
(G/POCl)(40/60) (%)	907,25	1603,37	1935,87
(G/GTA)(100/02) (%)	824,34	943,00	1100,00

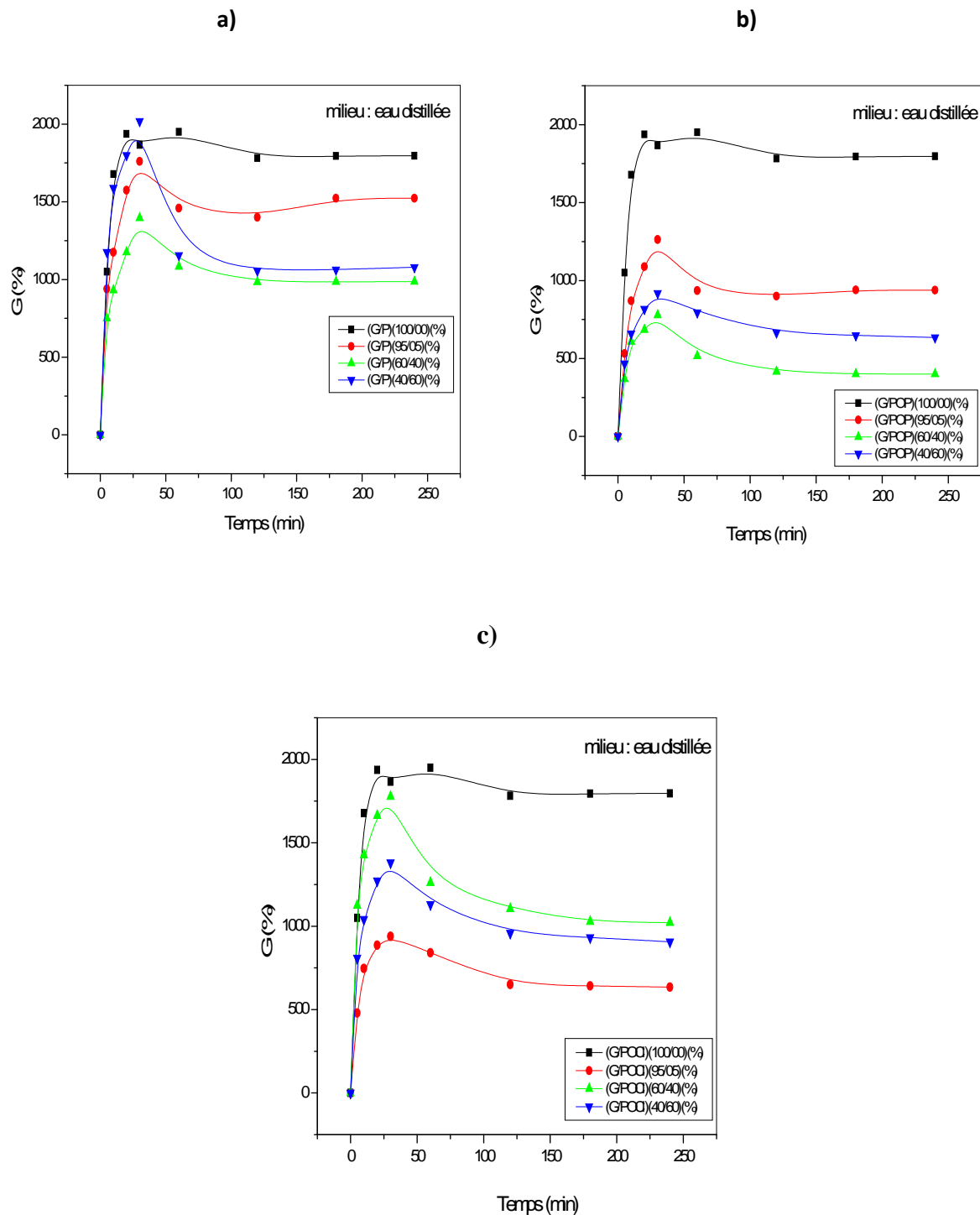


Figure III.2.10. Variation du taux de gonflement (%) des différents films à une T_{amb} en fonction du temps dans l'eau distillée : **a)** (G/P) (%), **b)** (G/POP) (%) et **c)** (G/POCl) (%).

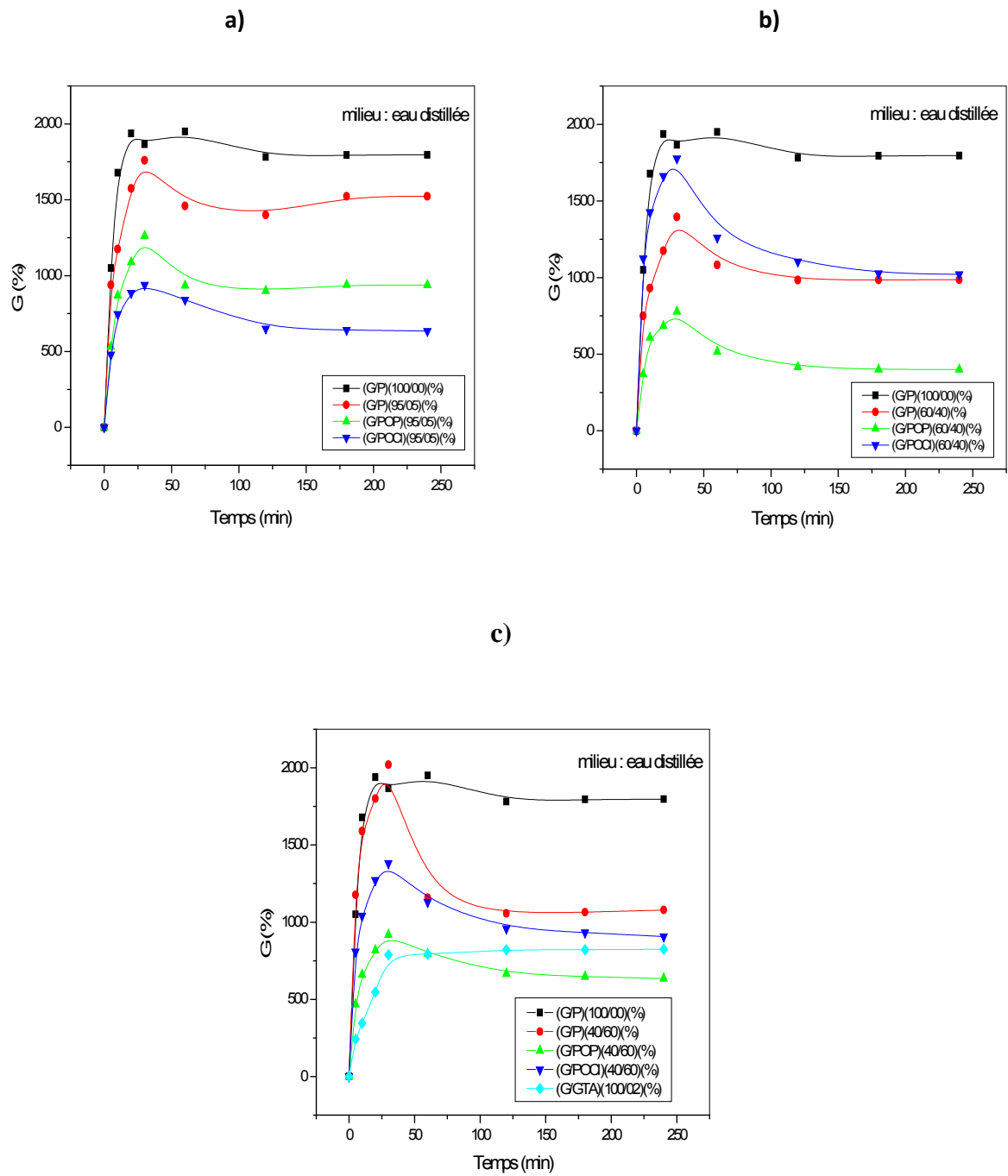


Figure III.2.11. Variation du taux de gonflement (%) des différents films à une T_{amb} en fonction du temps dans l'eau distillée : **a)** (G/P) (95/05) (%), **b)** (G/P) (60/40) (%), **c)** (G/POCl) (40/60) (%) et (G/GTA) (98/02) (%).

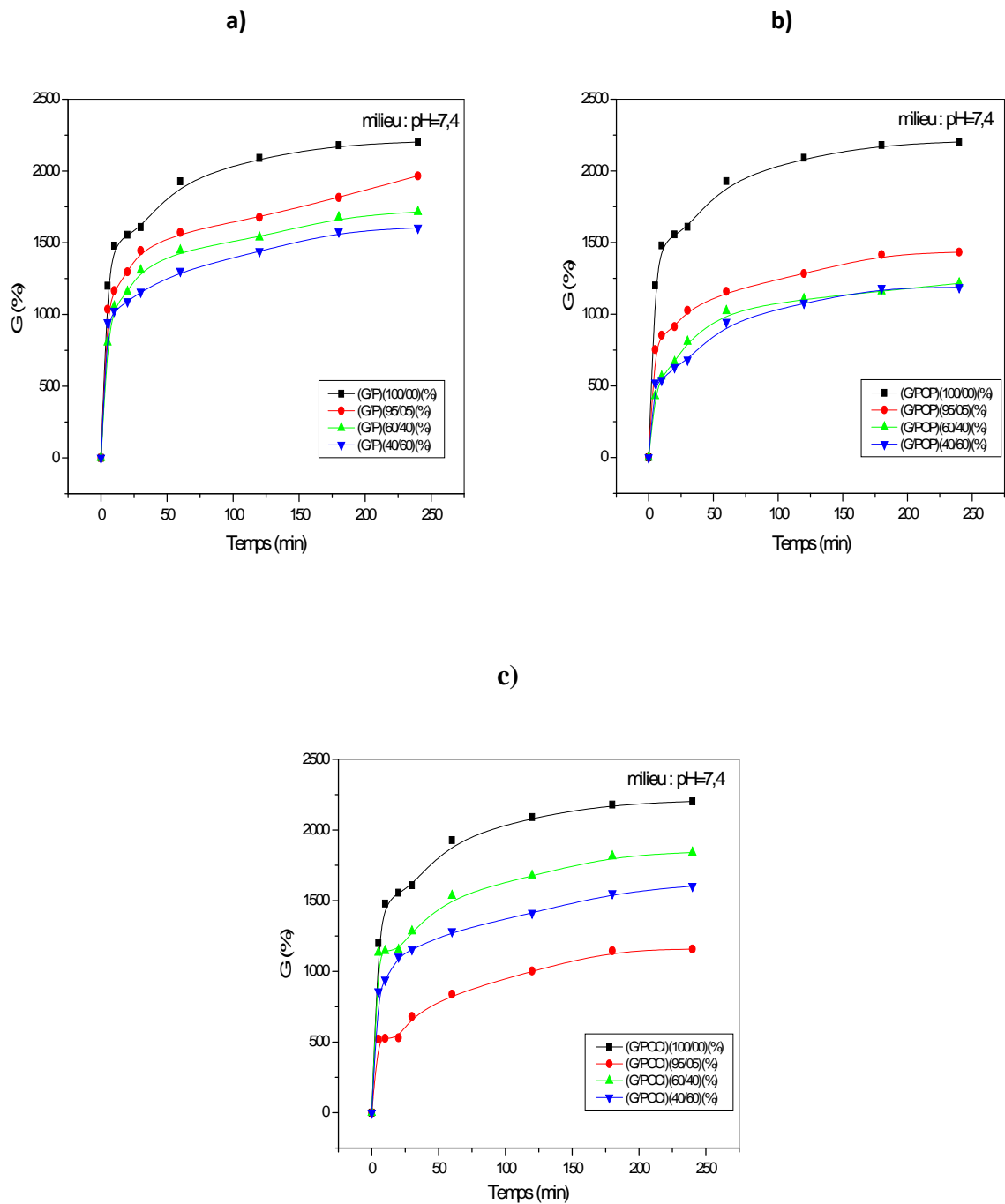


Figure III.2.12. Variation du taux de gonflement (%) des différents films à une T_{amb} en fonction du temps dans un pH=7,4: **a)** (G/P)(%) **b)** (G/POP)(%) et **c)** (G/POCl)(%).

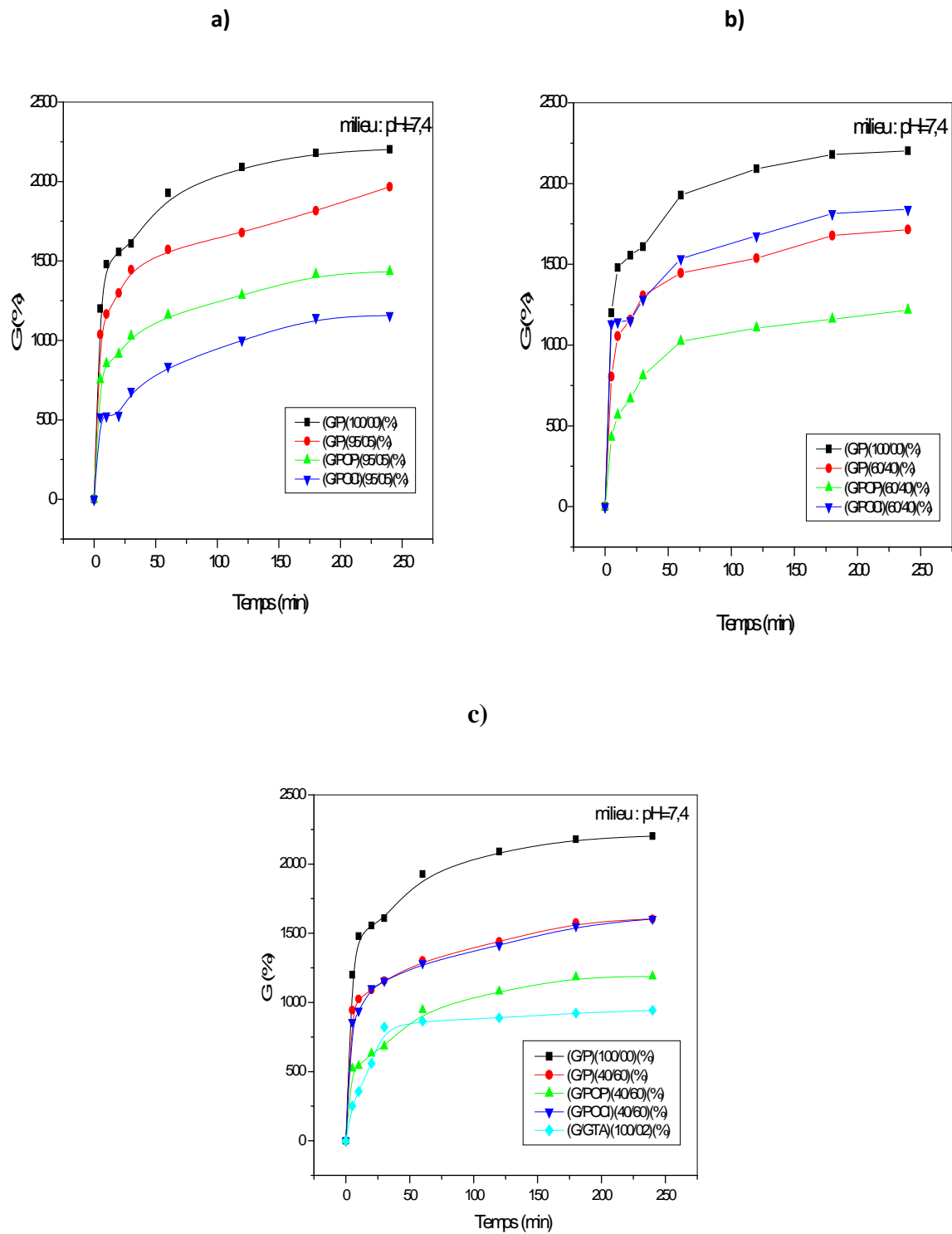


Figure III.2.13. Variation du taux de gonflement (%) des différents films à une T_{amb} en fonction du temps dans un $pH=7,4$: **a)** (G/P)(95/05)(%)(%), **b)** (G/P)(60/40)(%), **c)** (G/POCl)(40/60)(%) et (G/GTA)(100/02)(%).

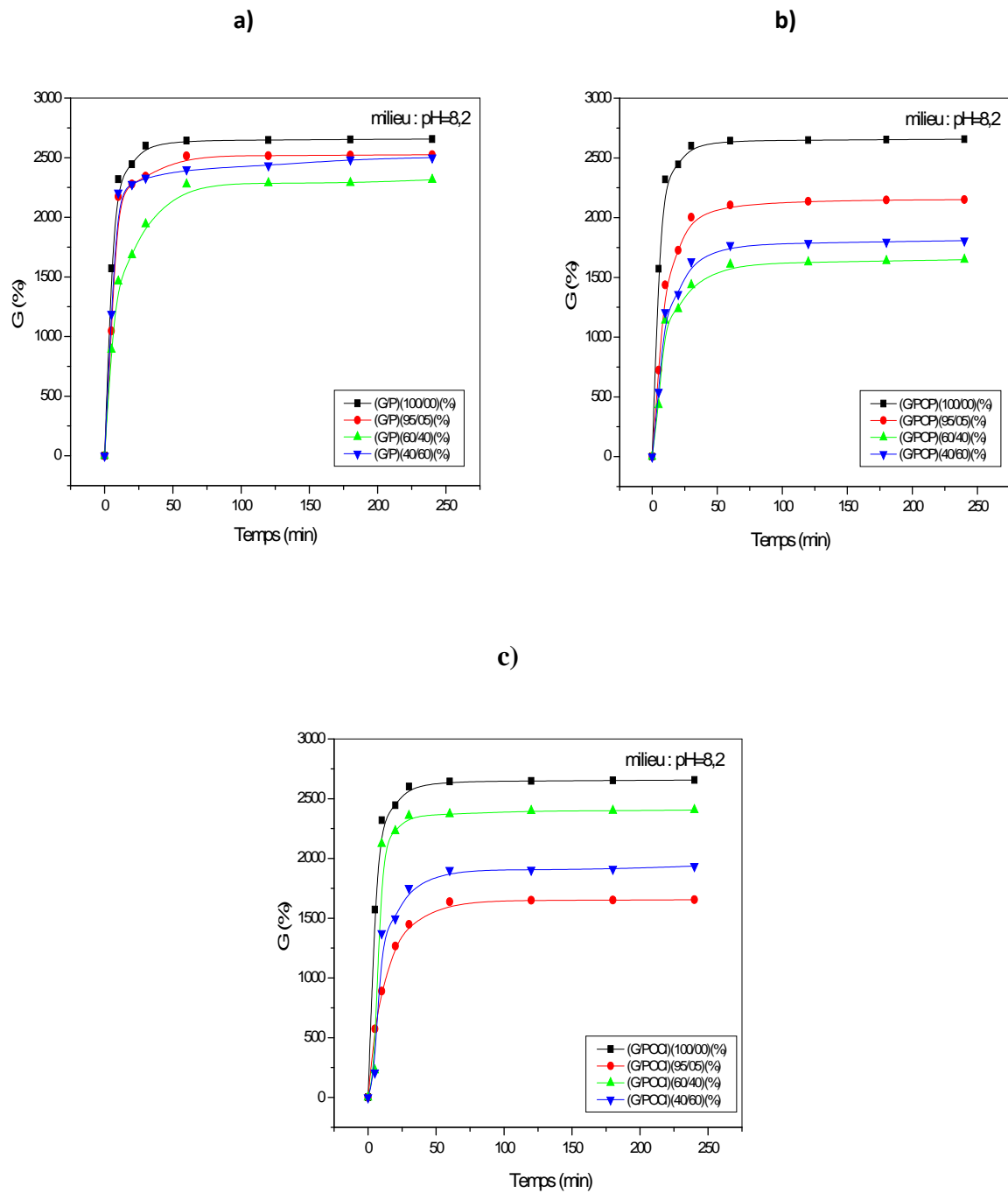


Figure III.2.14. Variation du taux de gonflement (%) des différents films à une T_{amb} en fonction du temps dans un pH=8,2: **a)** (G/P)(%), **b)** (G/POP)(%) et **c)** (G/POCl)(%).

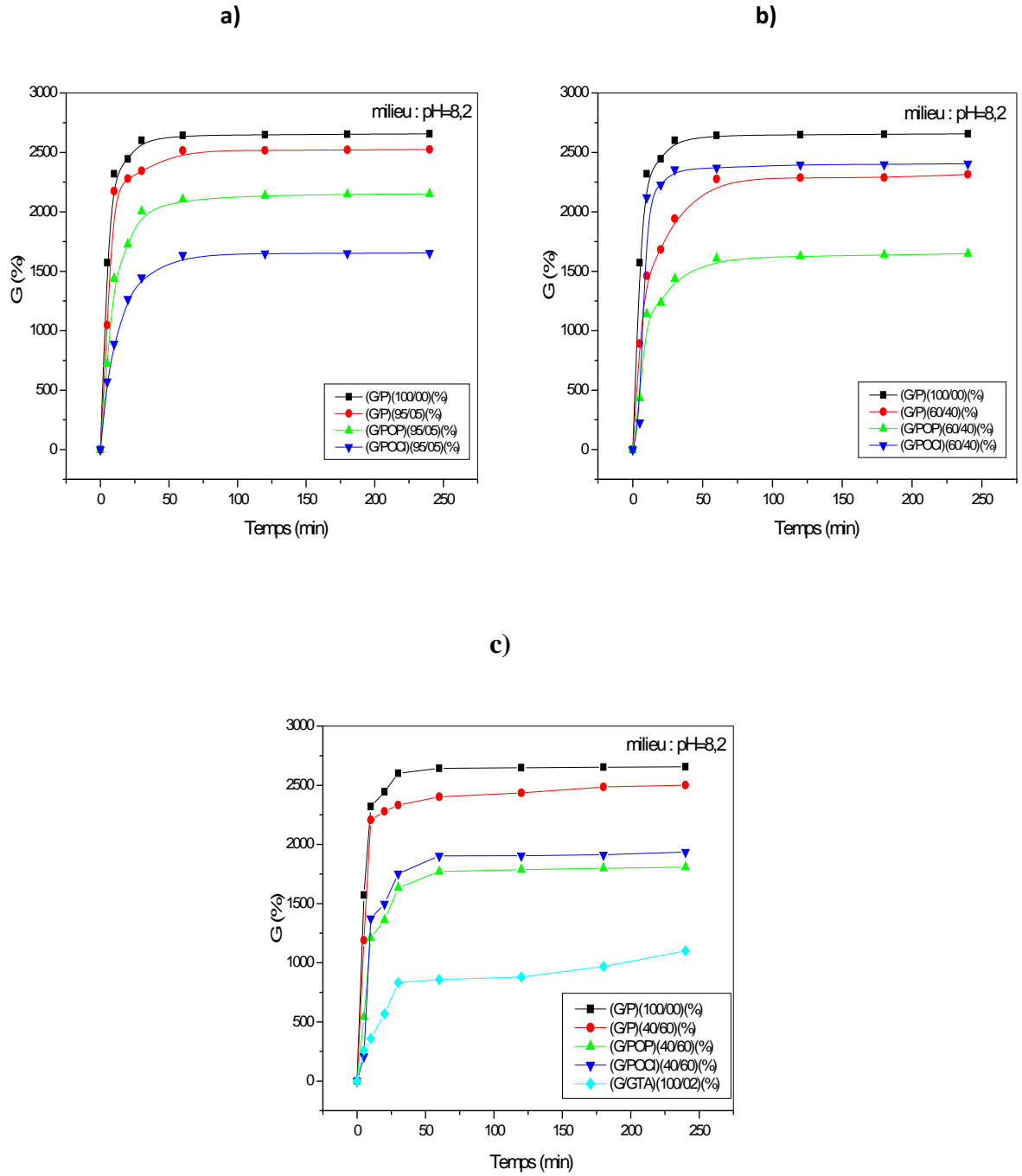


Figure III.2.15. Variation du taux de gonflement (%) des différents films à une T_{amb} en fonction du temps dans un pH=8,2: **a)** (G/P)(95/05)(%)(%), **b)** (G/P)(60/40)(%), **c)** (G/POCl)(40/60)(%) et (G/GTA)(100/02)(%).

III.2.7. Evaluation de la compatibilité avec le sang :

Le test d'hémolyse a montré que les hydrogels sont non hémolytiques dans la nature. Le potentiel hémolytique du matériau est défini par la mesure du degré d'hémolyse qui peut être causé par la matière quand il entre en contact avec le sang. Le **tableau III.2.4** montrent le pourcentage d'hémolyse du sang en contact avec différents échantillons à 37 °C pendant 60 min. Tous les échantillons ont été jugés non-hémolytiques (**Figure III.2.16**). Ils ont un niveau inférieur d'hémolyse à 5% (**Fan *et al.*, 2012**).

Tableau III.2.4. Potentiel hémolytique des hydrogels.

Composé	Gélatine	Pectine	POP	POCl	(G/P) (60/40) (%)	(G/POP) (60/40) (%)	(G/POCl) (60/40) (%)	(G/GTA) (100/02) (%)
Hémolyse (%)	1,2	0,45	0,6	0,93	1,37	1,39	1,66	4,39

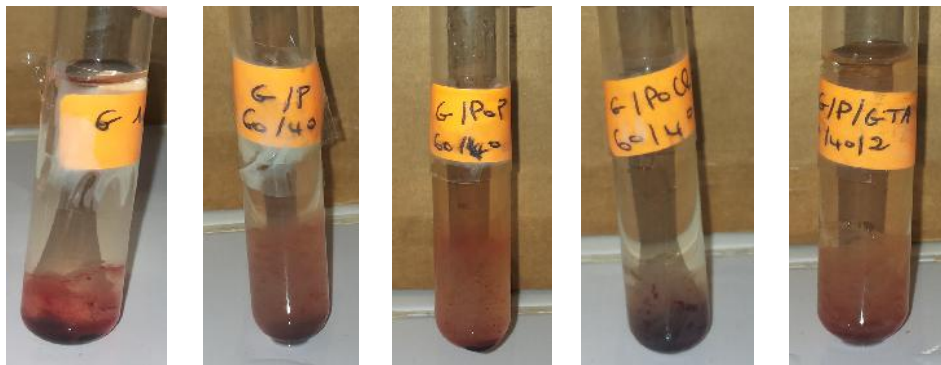


Figure III.2.16. Essais de compatibilité avec le sang.

Partie 3: Caractérisation des nouveaux matériaux à base de pectine et/ou pectine oxydées additionnées au chitosane.

III.3.1. Degré de réticulation:

Selon la méthode décrite par **Rodrigo et al., & Gómez-Mascaraque et al., (Rodrigo et al., 2006 & Gómez-Mascaraque et al., 2014)**, il ressort à partir de la **figure III.3.1.a** entre le premier et le second point dans l'intervalle 22,5 et 25 ml de NaOH (0,1 N) que le taux d'amino libres porté par le chitosane seul dissous dans le HCl à 0,1N est de l'ordre de 20,12 %. Par contre, après addition des différentes pectines natives et/ou oxydées y compris la réticulation par le glutaraldehyde, les différentes courbes montrent le passage direct et continu du premier plateau vers le second plateau sans aucune déviation intermédiaire. Indication majeure sur la transformation voire la consommation de groupements amino libres du chitosane. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Hoffmann et al., (Hoffmann et al., 2009)**.

D'après la **figure III.3.1.b**, le plateau qui correspond à la quantité des amino libres du chitosane dissous dans l'acide lactique disparaît, cela peut être probablement justifié par l'interaction entre l'amine libre du chitosane et le C=O de l'acide lactique.

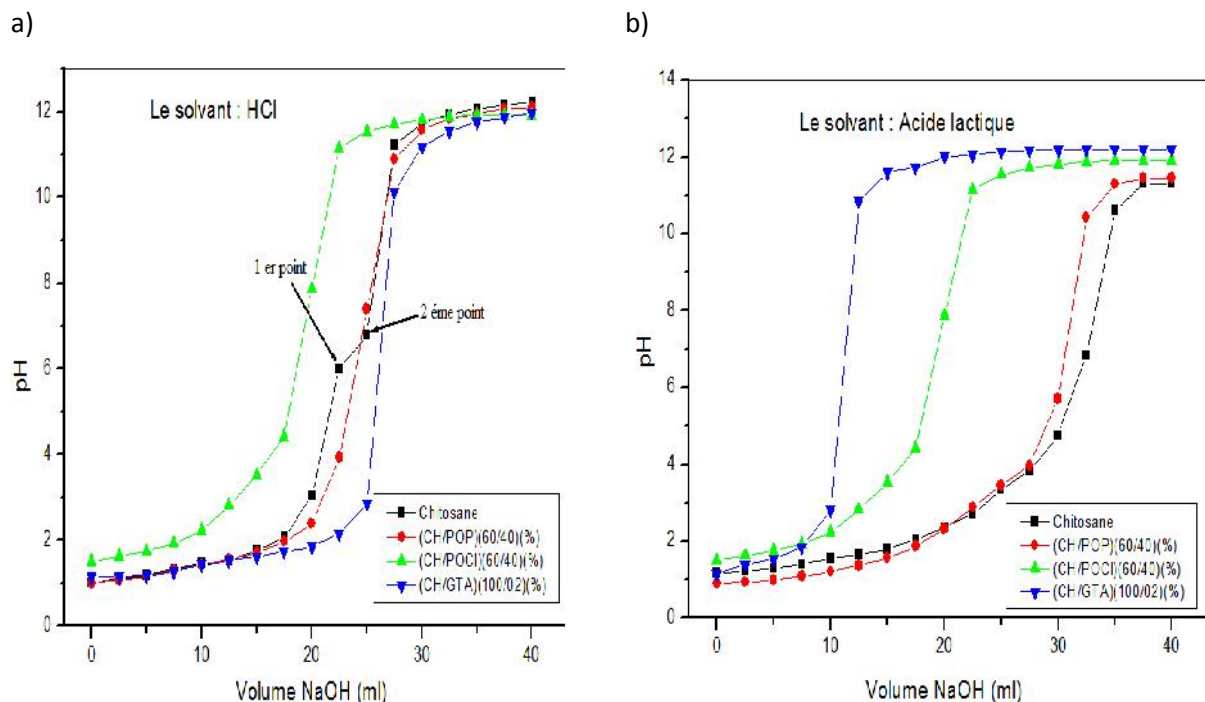


Figure III.3.1. pH titration du chitosane et chitosane réticulé par le glutaraldehyde ou pectines oxydées dans les 2 milieux «HCl (a) et Acide lactique (b)».

III.3.2. Spectroscopie infrarouge IR-TF :

➤ Le chitosane :

Le spectre infrarouge du chitosane solubilisé dans l'acide chlorhydrique représente dans la **figure III.3.2** la bande d'absorption à 3427 cm^{-1} attribuée aux vibrations d'élongation des $-\text{NH}_2$ et $-\text{OH}$.

Les pics autour 2923 et 2854 cm^{-1} présents sur la **figure III.3.2** sont dus à la vibration d'élongation asymétrique et symétrique de la liaison C-H des méthyles, respectivement. Il apparait également deux pics d'absorption d'intensité moyenne à 1650 et 1564 cm^{-1} qui correspondent à l'élongation de la double liaison C=O des amides et la déformation angulaire (cisaillement) de la liaison N-H des amines (**Belalia, 2006**). A titre indicatif pour l'étude antibactérienne que nous avons faite (voir ci après), nous avons calculé le degré d'acétylation (DDA) du chitosane est de 60,66% en se servant de l'équation donnée par **Frantz (Frantz, 2008)**.

Le degré de désacétylation a été calculé en utilisant l'équation de la ligne de base à 1650 et 3427 cm^{-1} (DDA=60,66%) (**Abdulwadud et al., 2013**).

Les pics autour 897 et 1152 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation C-O-C du chitosane.

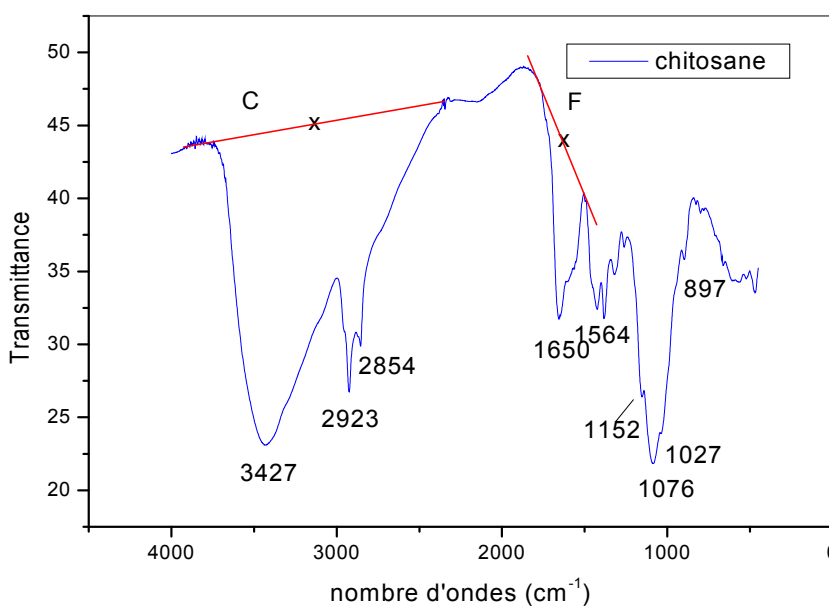


Figure III.3.2. Spectre IR-TF du film de chitosane.

$$\text{DDA}\% = 100 - A_{1650} / A_{3450} \times 115$$

Avec:

$$A_{1650} = -\log \left(\frac{\text{Transmittance à } 1650 \text{ cm}^{-1}}{100} \right);$$

Et

$$A_{3450} = -\log \left(\frac{\text{Transmittance à } 3450 \text{ cm}^{-1}}{100} \right);$$

115 = Coefficient de correction de la ligne de base;

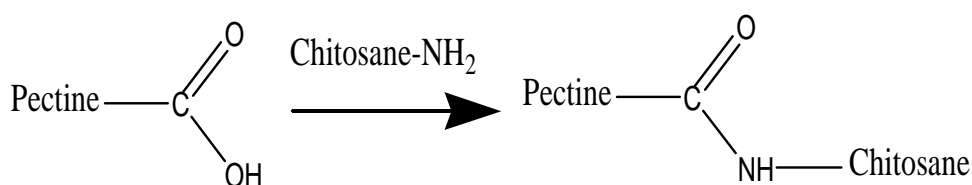
$$\text{DDA} = 60, 66\%.$$

➤ **Mélange (chitosane/pectine) (60/40) (%):**

L'ajout du chitosane à la pectine a visiblement atteint la structure du polysaccharide et vice versa (**figure III.3.3**). Nous avons un déplacement des pics de 1742 et 1613 cm^{-1} à 1745 et 1626 cm^{-1} qui correspondent aux carboxyles estérifiés et libres, respectivement.

Un nouveau pic à 1520 cm^{-1} qui était absent dans la pectine et présent dans le chitosane (amide I) apparaît. Ainsi, l'intensité du pic à 828 cm^{-1} qui correspond à la structure saccharidique du chitosane augmente.

La réaction proposée entre les deux polysaccharides se présente comme suit :



Amidation entre le chitosane et la pectine.

Des interactions physiques entre les charges positives proviennent du chitosane (Chi-NH_3^+) et les charges négatives de la pectine (pect-COO^-) peuvent être produites.

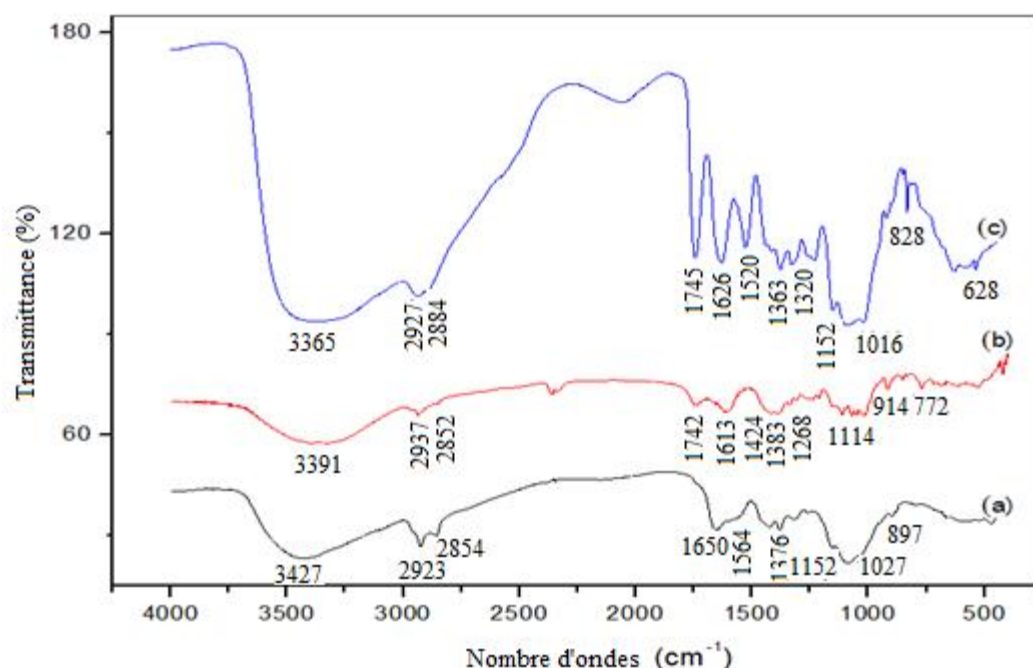
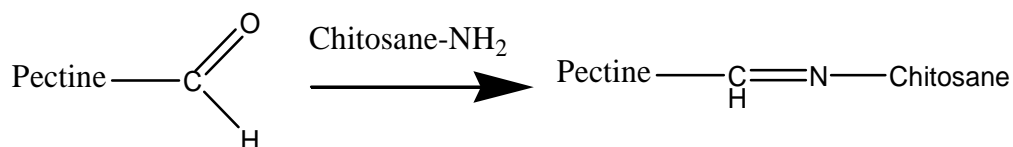


Figure III.3.3. Spectres infrarouge du chitosane (a), de la pectine (b) et du mélange (CH/P) (60/40) (%) (c).

➤ **Chitosane réticulé par les pectines oxydées et/ou le glutaraldehyde :**

D'après la **figure III.3.4**, nous avons une diminution remarquable du pic à 1385 cm^{-1} avec un faible déplacement vers 1376 cm^{-1} ainsi un shifting du pic de 1564 cm^{-1} vers 1525 cm^{-1} a été observé. Nous observons aussi la diminution de l'intensité du pic à 1738 cm^{-1} appartenant au chitosane/pectine oxydée. Entre $1000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$, aucune similitude n'est observée, cet intervalle représente une importance à ne pas négliger car il dessine aussi les vibrations de valence de groupement fonctionnel. Ce qui nous persuade qu'il y a formation de la base de schiff (-C=N).

La réaction entre le chitosane et la pectine oxydée peut être schématisée comme suit :



Réaction du chitosane avec la pectine oxydée par le periodate.

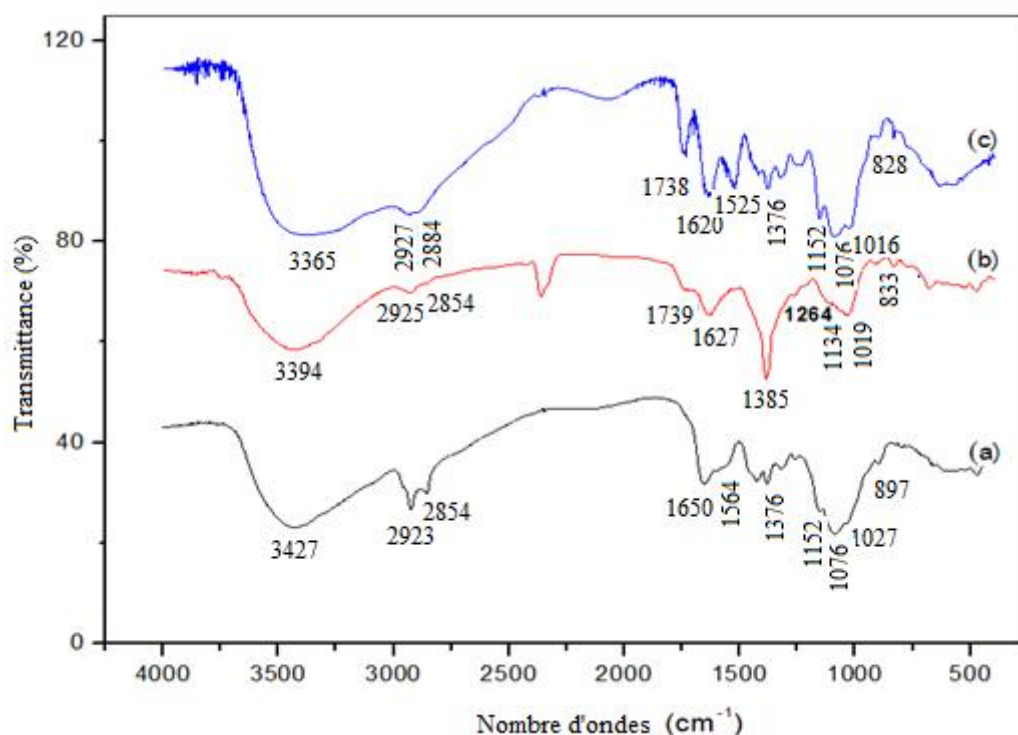


Figure III.3.4. Spectres infrarouge du chitosane (a), de la pectine oxydée par le periodate (b) et de (CH/POP) (60/40) (%) (c).

L'étude comparative par spectroscopie IR-TF entre le chitosane et le mélange (CH/POCl)(60/40)(%) montre que les deux réseaux sont distincts. Nous avons la diminution remarquable de l'intensité du pic à 1738 cm^{-1} . Ce qui confirme qu'il y a une interaction entre les deux biopolymères (**figure III.3.5**).

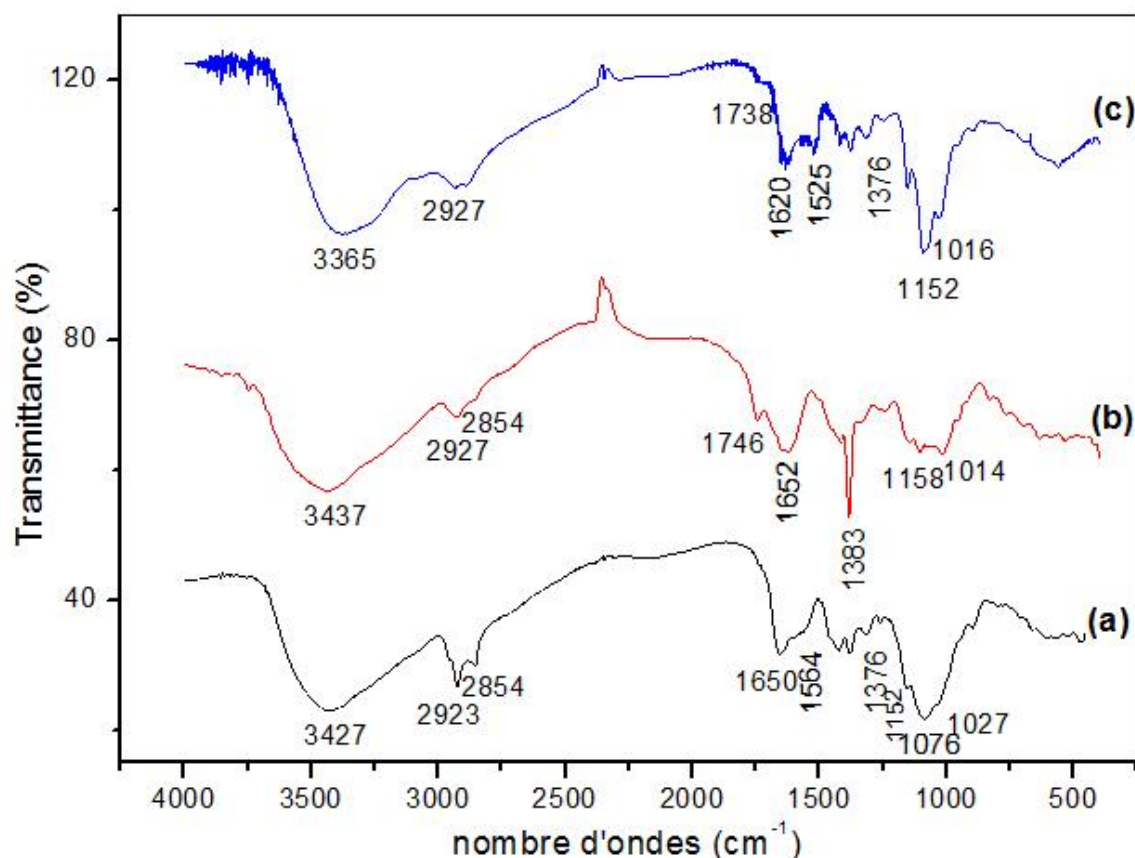


Figure III.3.5. Spectres infrarouge du chitosane (a), de la pectine oxydée par le chlore actif (b) et de (CH/POCl) (60/40) (%) (c).

D'après la **figure III.3.6**, nous observons l'apparition d'un nouveau pic à 1736 cm^{-1} de faible intensité et la disparition du pic à 1564 cm^{-1} dans le spectre CH/GTA en raison de la perte des amines libres, ce qui indique la formation de la base de schiff après réticulation du chitosane par le glutaraldehyde. Ces résultats sont en accords avec le spectre infrarouge du mélange (CH/POCl)(60/40)(%) et avec les travaux menés par Sudha *et al.*, (Sudha *et al.*, 2013).

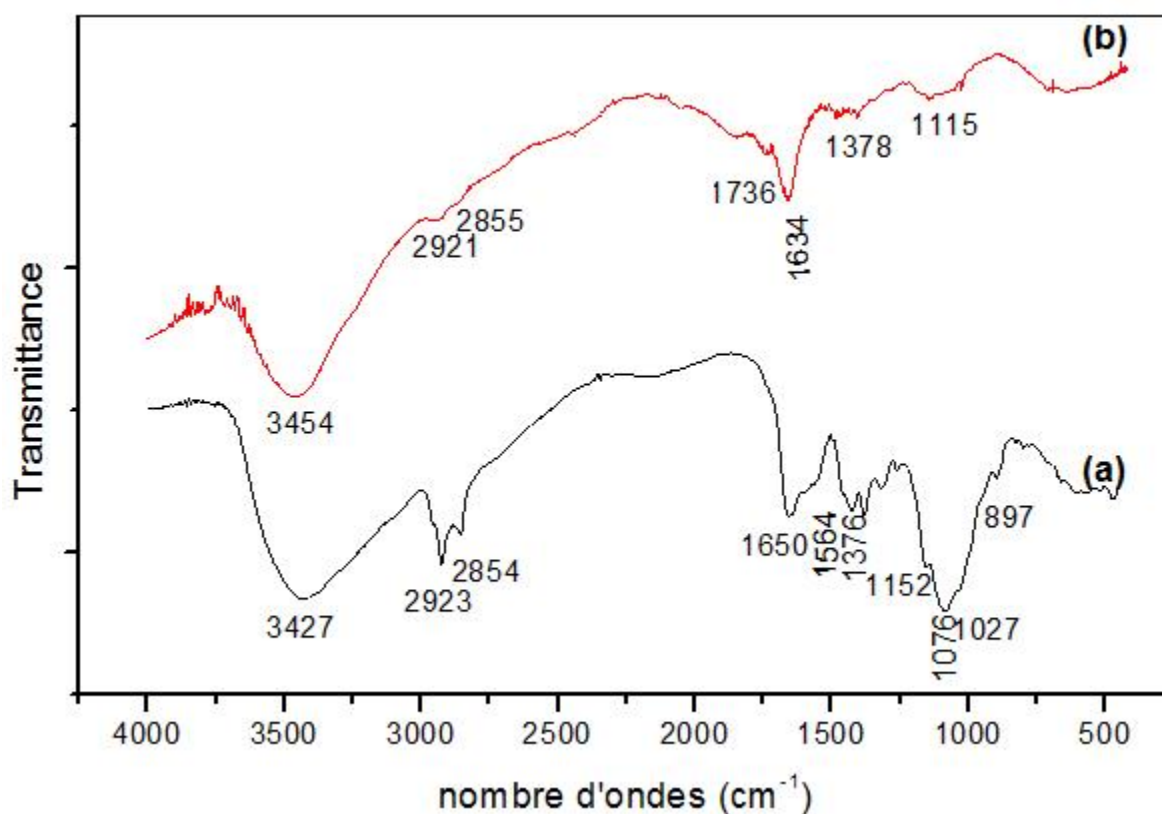
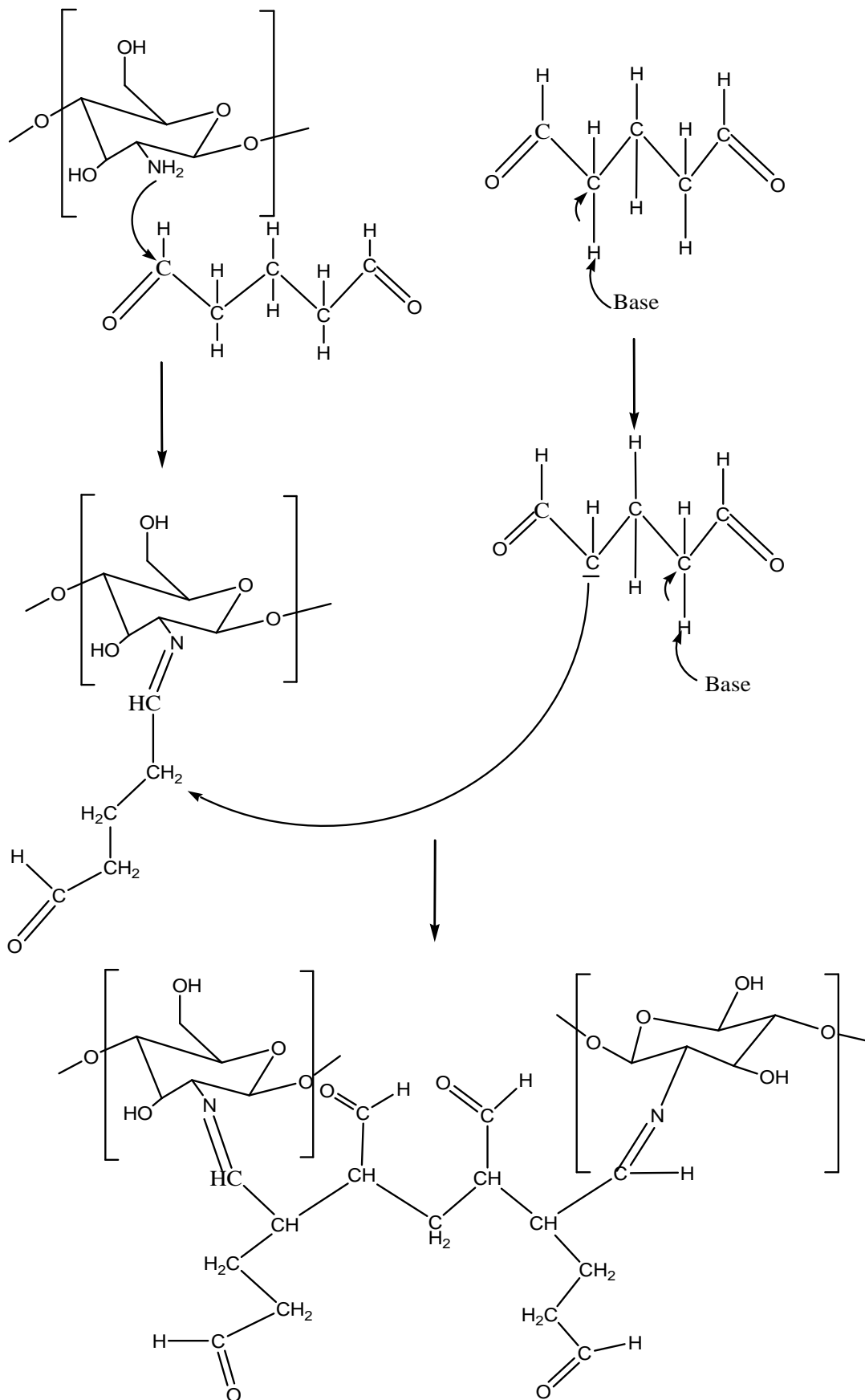


Figure III.3.6. Spectres infrarouge du chitosane (a), de (CH/GTA) (100/02) (%) (b).

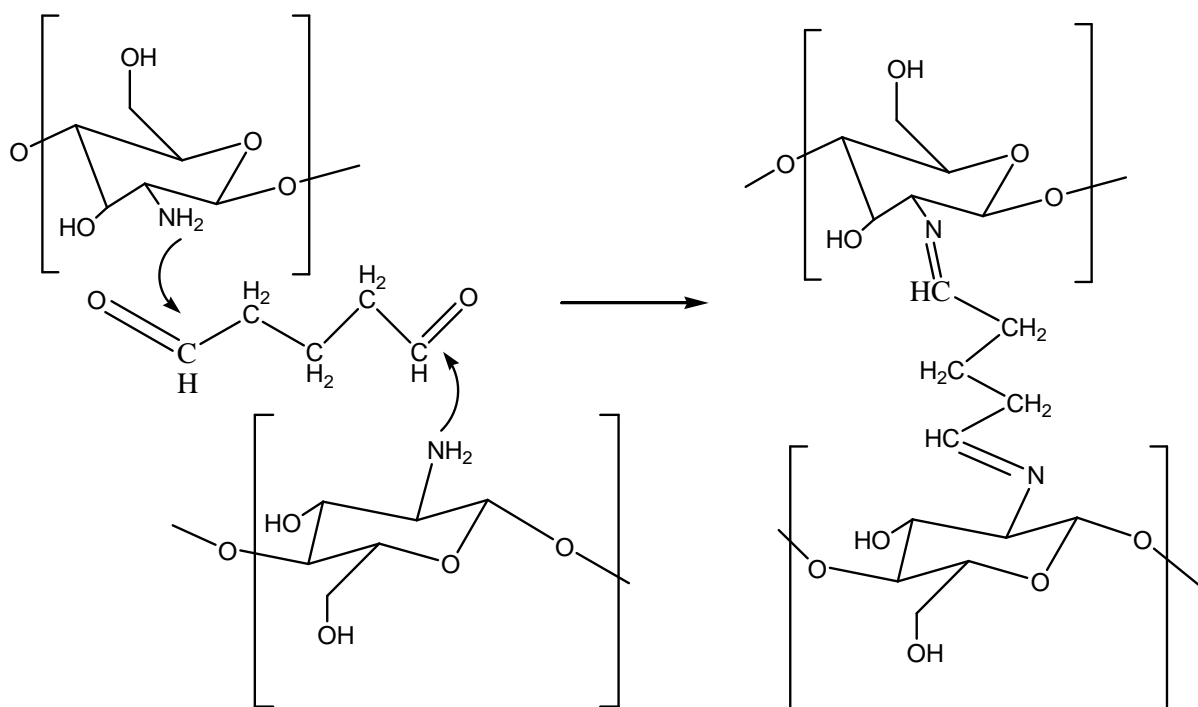
Deux mécanismes réactionnels ont été proposés par **Jessica *et al.***, (**Jessica *et al.***, 2007) pour démontrer la réticulation du chitosane par le glutaraldehyde :

Le premier, est par l'addition de Michael avec les aldéhydes terminaux qui conduisent à la formation des groupes imines (schéma 1)



Réticulation du chitosane par le glutaraldehyde par l'addition Michael (Jessica *et al.*, 2007).

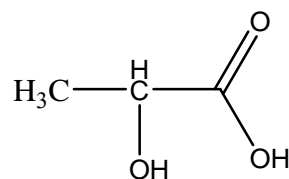
La seconde méthode principale de réticulation, formation de la base de schiff, conduit à des fonctions imines (schéma 2)



Réticulation du chitosane par le glutaraldéhyde pour former la base de schiff (**Jessica *et al.*, 2007**).

➤ Chitosane solubilisé dans l'acide lactique

Les spectres infrarouges du chitosane et les chitosane modifiés sont présentés dans la **figure III.3.7** où on observe des disparitions et des apparitions des pics. Dans le cas du chitosane, l'apparition du pic à 1736 cm^{-1} est reliée au carboxyle de l'acide lactique.



Structure chimique de l'acide lactique

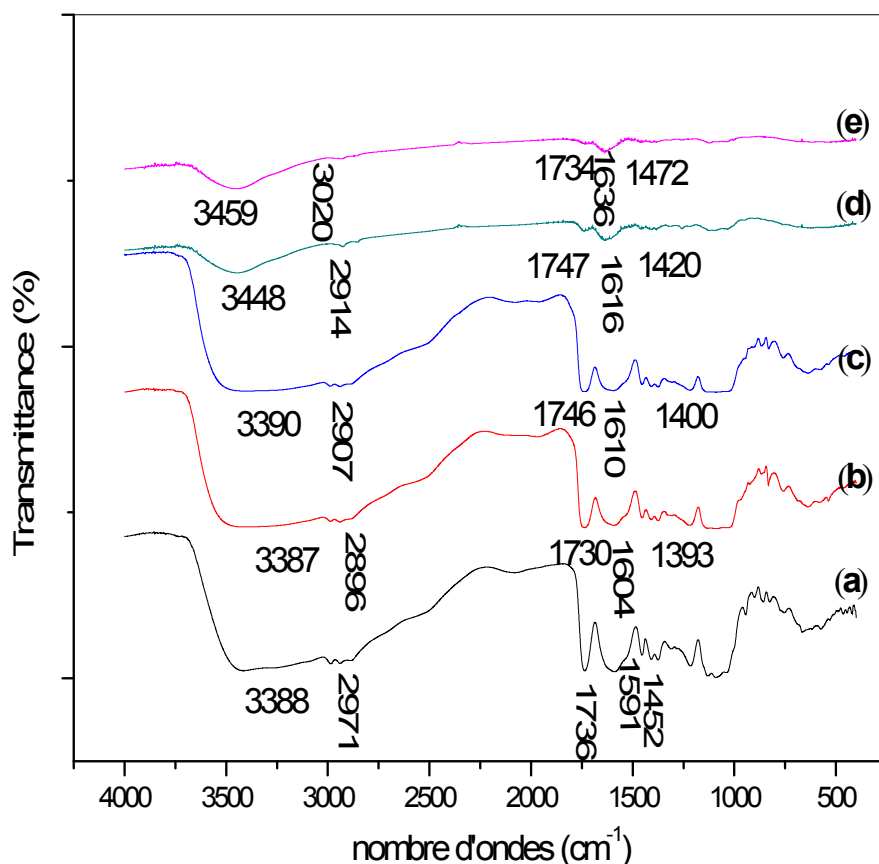


Figure III.3.7. Spectres IR-TF du l'acide lactique: **a)** chitosane, **b)** (CHP) (60/40) (%), **c)** (CH/POP) (60/40) (%), **d)** (CH/POCl) (60/40) (%) et **e)** (CH/GTA) (100/02) (%).

III.3.3. Diffraction des rayons X :

➤ Le chitosane solubilisé dans l'HCl :

Le diffractogramme des rayons X du chitosane exhibe des pics larges de diffraction à $2\theta=9,75^\circ$ et $20,07^\circ$. Selon **Monarul et al.**, (**Monarul et al.**, 2011), le chitosane présente deux grands pics caractéristiques à $9,9-10,7^\circ$ et $19,8-20,7^\circ$ (**figure III. 3.8**).

L'addition de la pectine et de la pectine oxydée induisent une disparition du premier angle de diffraction à $9,75^\circ$ et l'apparition d'un nouveau pic à $13,9^\circ$ dans le cas de (CH/P) (60/40) (%) qui se déplace vers $15,12^\circ$ et $14,15^\circ$ dans le cas (CH/POCl) (60/40) (%) et (CH/POP) (60/40) (%). Il correspond au pic caractéristique de la cristallinité de la pectine. Ce

phénomène de changement structural et de diminution de cristallinité est attribué probablement à l'interaction entre les deux biopolymères.

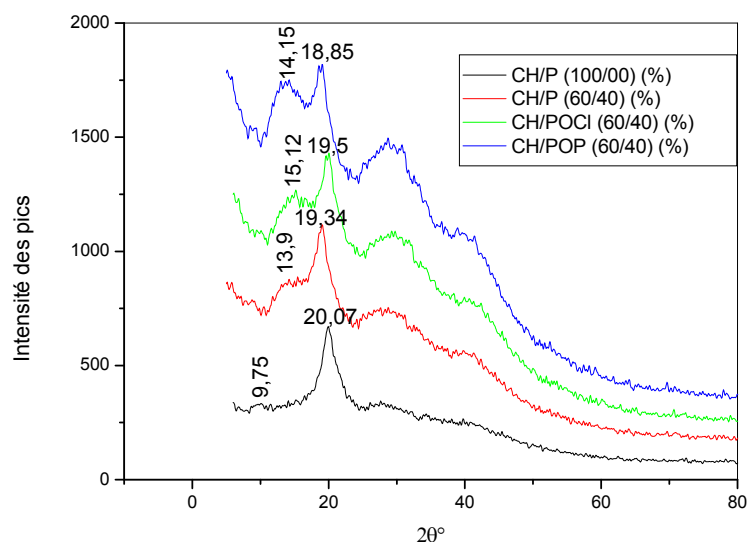


Figure III.3.8. Diffractogrammes des rayons X du chitosane; (CH/P) (60/40) (%), (CH/POCl) (60/40) (%) et (CH/POP) (60/40) (%) solubilisé dans l'HCl.

➤ **Le chitosane solubilisé dans l'acide lactique:**

La différence entre le diffractogramme de chitosane et de mélange solubilisé dans l'acide lactique réside dans le déplacement du pic à 21,33° dans le cas du chitosane vers des valeurs inférieures pour (CH/P), (CH/POCl) et (CH/POP) (**Figure III.3.9**).

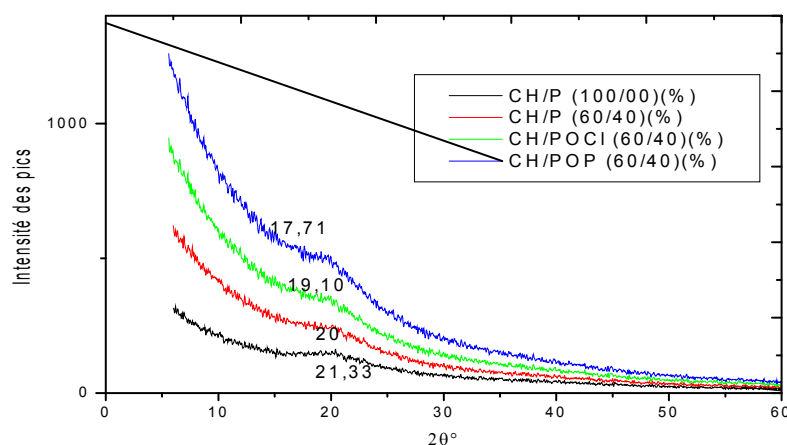


Figure III.3. 9. Diffractogrammes des rayons X du chitosane; (CH/P) (60/40) (%), (CH/POCl) (60/40) (%) et (CH/POP) (60/40) (%) solubilisé dans l'acide lactique.

III.3.4. Mesure de la turbidité par l'UV visible à la D.O à 600nm :

Selon le **tableau III.3.1**, on observe que la densité optique à 600 nm augmente avec la quantité des pectines. Le chitosane seul et le mélange à faible concentration de pectines (CH/P) (95/05) (%); (CH/POP) (95/05) (%); (CH/POCl) (95/05) (%) se solubilisent complètement après 2heures dans l'eau distillée à T=37°C alors que pour les autres formulations, la solubilisation nécessite un temps dépassant 48h. Le changement d'aspect des films solubilisés dans différents milieux apparait clairement à l'œil nu (voir **les figures Annexe 2**).

Tableau III.3.1. La turbidité des différents échantillons à T=25°C.

Solvant	Milieux Composition	Eau	pH=7,4	pH=8,2
Acide Lactique	Pectine	0	00	00
	POP	00	00	00
	POCl	00	00	00
	Chitosane	0,3	0,7	0,9
	(CH/P) (95/05)(%)	0,4	1,0	1,2
	(CH/P) (60/40)(%)	0,6	1,7	1,3
	(CH/P) (40/60)(%)	0,9	2,3	1,4
	(CH/POP) (95/05)(%)	0,3	0,8	1,3
	(CH/POP) (60/40)(%)	0,6	1,0	1,3
	(CH/POP) (40/60)(%)	1,7	1,8	1,4
	(CH/POCl) (95/05)(%)	0,3	0,7	0,8
	(CH/POCl) (60/40)(%)	3,0	1,8	2,6
	(CH/POCl) (40/60)(%)	3,7	2,0	2,7
HCl	Chitosane	0,4	1,0	0,7
	(CH/P) (95/05)(%)	0,6	1,2	0,9
	(CH/P) (60/40)(%)	0,9	1,6	1,4
	(CH/P) (40/60)(%)	1,5	1,7	1,6
	(CH/POP) (95/05)(%)	0,3	1,4	0,8
	(CH/POP) (60/40)(%)	0,9	1,5	0,9

	(CH/POP) (40/60)(%)	1,6	1,8	1,1
	(CH/POCl) (95/05)(%)	0,4	0,4	0,9
	(CH/POCl) (60/40)(%)	3,0	0,8	1,4
	(CH/POCl) (40/60)(%)	2,3	1,3	1,7

III.3.5. Evaluation de la compatibilité avec le sang :

Le test d'hémolyse a montré que les hydrogels sont non hémolytiques dans la nature. Le potentiel hémolytique du matériau est défini par la mesure du degré d'hémolyse qui peut être causé par la matière quand il entre en contact avec le sang. **Le tableau III.3.2** montre le pourcentage d'hémolyse du sang en contact avec différents échantillons à 37 °C pendant 60 min. Tous les échantillons sont non-hémolytiques. Ils ont un niveau inférieur d'hémolyse à 5% (**Fan et al., 2012**).

Tableau III.3.2. Potentiel hémolytique des hydrogels.

Solvants	Composition des films	Hémolyse (%)
Acide lactique	Pectine	0,45
	POP	0,60
	POCl	0,93
	Chitosane	2,27
	(CH/P)(60/40)(%)	2,57
	(CH/POP)(60/40)(%)	2,78
	(CH/POCl)(60/40)(%)	2,84
	(CH/GTA)(100/02)(%)	3,84
HCl	Chitosane	2,45
	(CH/P)(60/40)(%)	1,36
	(CH/POP)(60/40)(%)	2,87
	(CH/POCl)(60/40)(%)	3,00
	(CH/GTA)(100/02)(%)	3,57

III.3.6. Activité antioxydante :

III.3.6.1. Activité antioxydante par la méthode du DPPH :

➤ Détermination quantitative du pouvoir antiradicalaire :

a) Principe du test :

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH[•]), est l'un des premiers radicaux utilisés pour étudier la relation structure / activité antioxydante des composés phénoliques.

Depuis, certaines modifications ont été apportées et un paramètre important a été introduit : la détermination de l'IC₅₀ définie comme étant la concentration en substrat entraînant une diminution de 50 % de l'absorption. A cette concentration, 50 % du DPPH est sous forme réduite. Ce paramètre a été introduit par Brand-Williams *et al.*, par analogie avec d'autres paramètres biologiques tels que la DL₅₀ (dose létale 50) qui est la dose qui, donnée en une seule fois provoque dans un délai de 14 jours la mort de la moitié des animaux (**Belkheiri, 2010**).

Récemment, Molyneux décrit les conditions de réalisation de ce test :

- Le volume de la réaction doit être compris entre 2 et 4 mL.
- Le solvant peut être le méthanol ou l'éthanol.
- Il n'y a pas de conditions de pH strictement définies.
- La concentration en DPPH[•] doit être comprise entre 50 et 200 µM afin d'avoir une absorbance inférieure à 1 (classiquement aux alentours de 180 µM).
- L'absorbance est mesurée à 517 nm.
- La durée totale de réaction est généralement fixée à 60 minutes.

Le radical stable DPPH[•] est utilisé comme radical oxydant pour être réduit par l'antioxydant (AH) et comme indicateur coloré de la réaction selon le mécanisme suivant:



(avec AH : antioxydant)

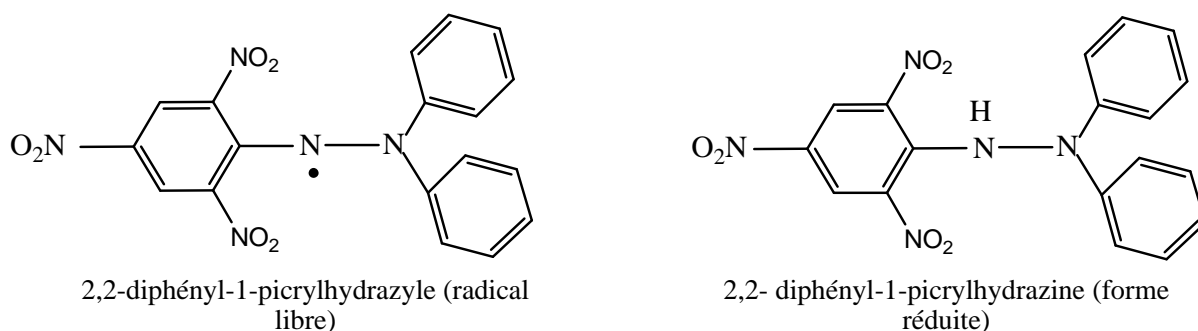


Figure III.3.10. Structure du 2,2- diphényl-2-picryl-hydrazyle et sa forme réduite.

Cependant, ce test peut poser des difficultés d'interprétation car le DPPH[•] n'est soluble que dans des solvants organiques, en particulier les alcools, et non en milieu aqueux ; ce qui empêche toute analyse d'antioxydants hydrosolubles.

Le dernier problème que pose ce radical est son instabilité à la lumière. Son absorbance à 518 nm décroît sans l'intervention d'un quelconque antioxydant. C'est pourquoi les tests réalisés avec le DPPH doivent impérativement se faire dans l'obscurité.

Le DPPH est initialement violet (**Figure III.3.11**), se décolore lorsqu'on lui associe avec un proton. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques (**Haddaoui, 2007**).

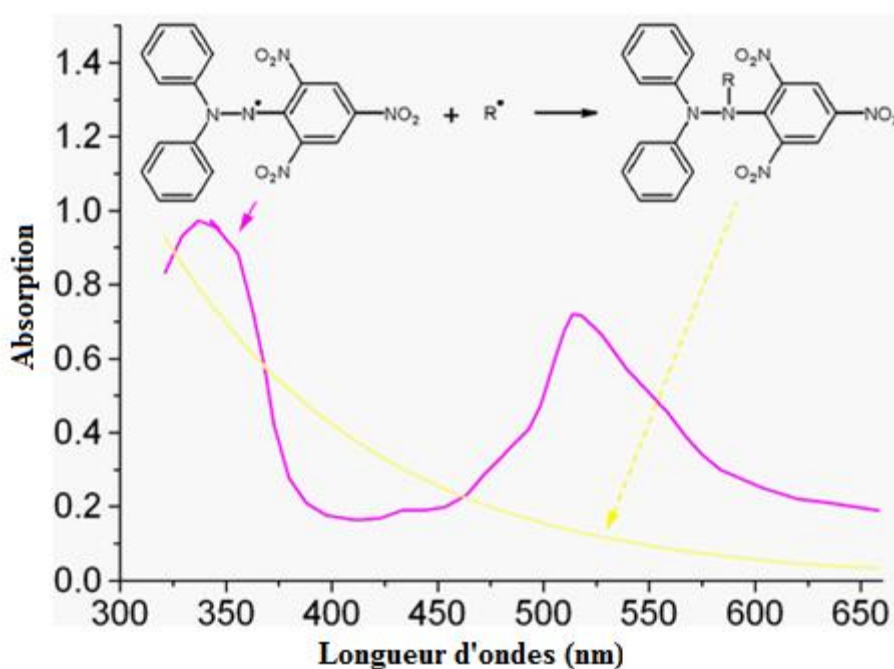
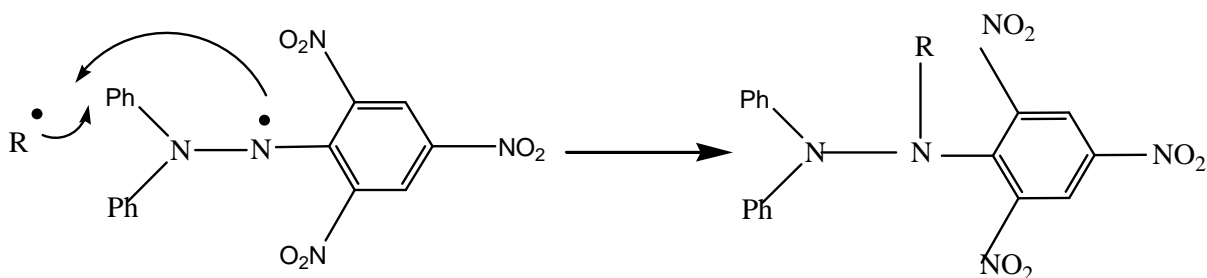


Figure III.3.11. Spectre UV-VIS du DPPH.



Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct des différentes substances de nos produits.

Afin de déterminer le pouvoir antiradicalaire des films à base de chitosane, de pectines et de composé de référence (BHT), nous avons tracé les courbes de la variation du pourcentage d'inhibition (I %) en fonction de la concentration massique (mg/l) (**Figures III.3.12**). A partir de ces deux courbes nous avons pu calculer les valeurs de IC₅₀ de chaque composés (**tableau III.3.3**; **Figure III.3.13**).

Tableau III.3.3. Les valeurs des IC₅₀ des différents composés.

Echantillons	CH	P	POCl	CH/P	CH/POCl	BHT
IC ₅₀ (mg/ml)	12,83	13,18	11,54	17,02	11,87	0,086

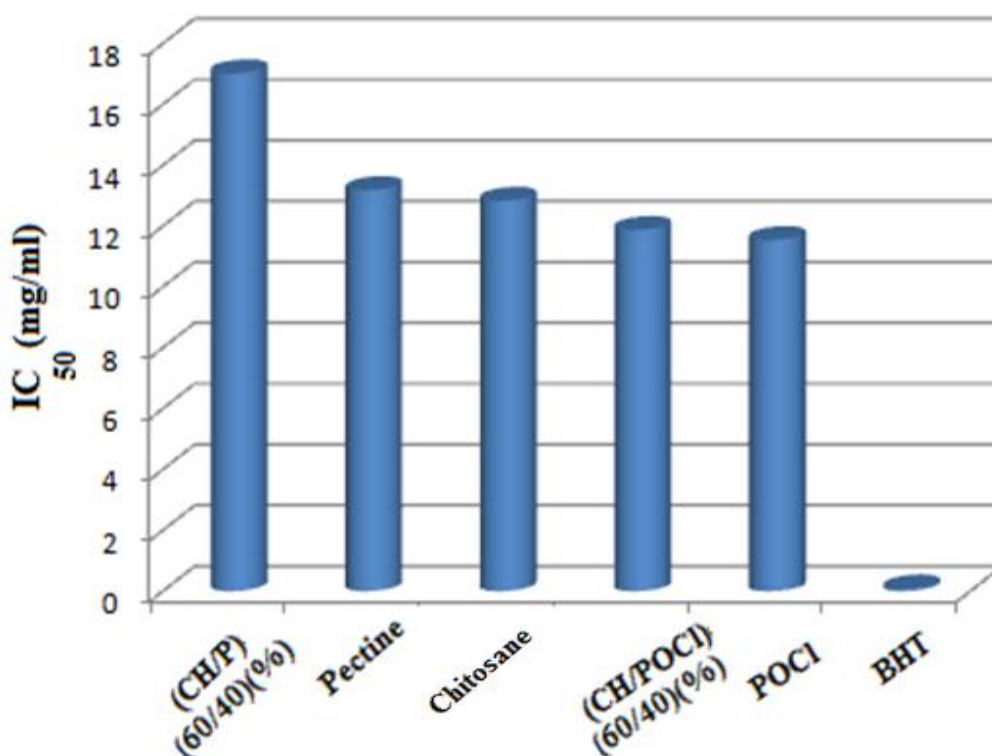
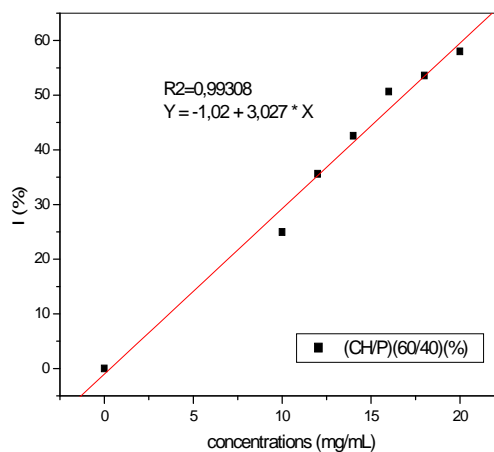
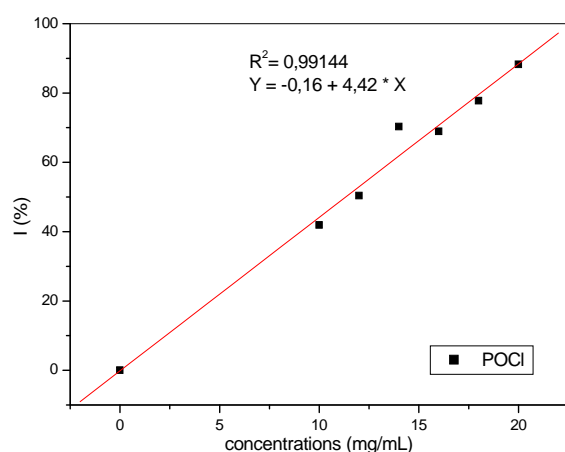
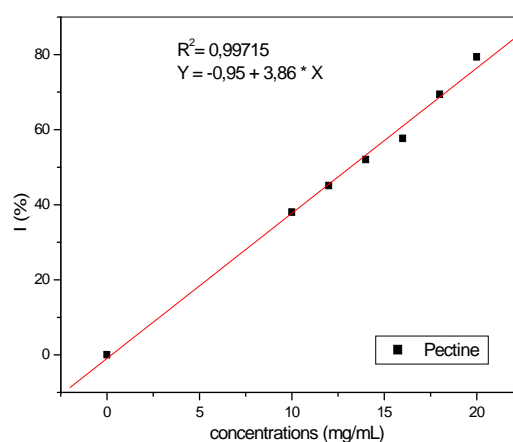
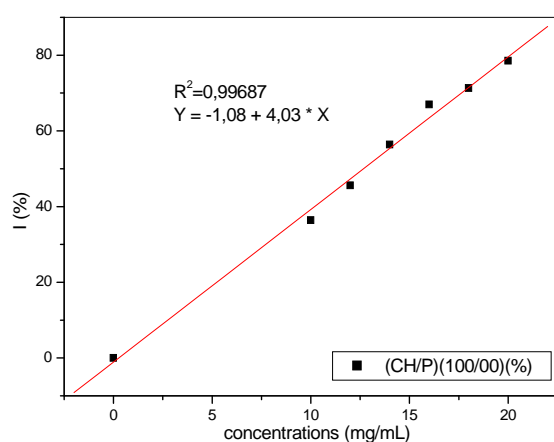


Figure III.3.13. IC₅₀ des films à base de chitosane et du BHT.

On remarque d'après les valeurs qui figurent dans le **tableau III.3.3** que le CH/POCl possède une activité antiradicalaire plus forte que le chitosane et la pectine seule. Nous rappelons que plus la valeur de IC₅₀ est faible plus le produit est puissant vis-à-vis des radicaux libres (**Haddaoui, 2007**). Il faut noter ici que l'activité antiradicalaire de (CH/POCl)(60/40)(%) (11,87 mg/ml) est plus forte que celle de chitosane (12,83 mg/l). Tous les échantillons montrent une capacité antiradicalaire moins forte par rapport au composé de référence (BHT), à titre d'exemple le BHT est 138 fois plus puissant que le film de CH/POCl.



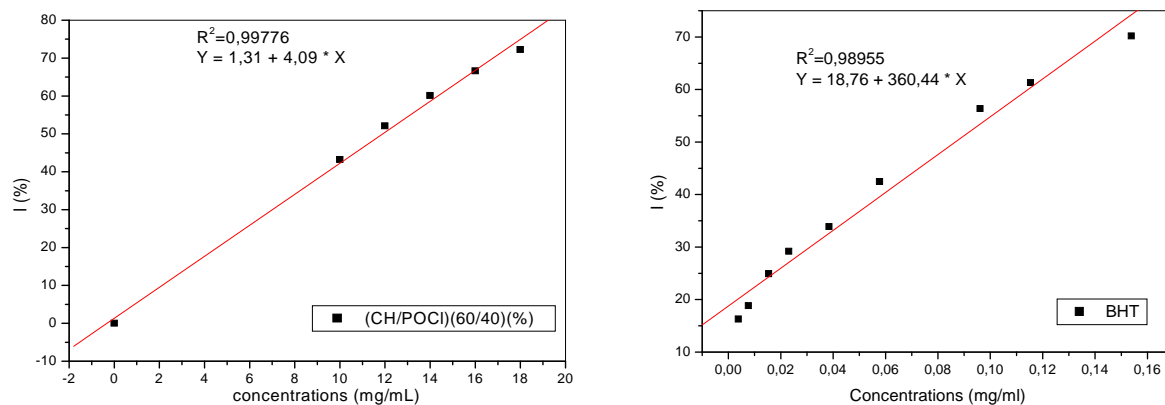


Figure III.3.12 Pourcentage d'inhibition en pourcent en fonction de la concentration des composés.

III.3.6.2. Activité antioxydante par la méthode de la réduction de fer :

Les résultats de l'activité réductrice des produits préparés sont représentés dans la figure III.3.14. Nous constatons que la capacité réductrice augmente avec la concentration.

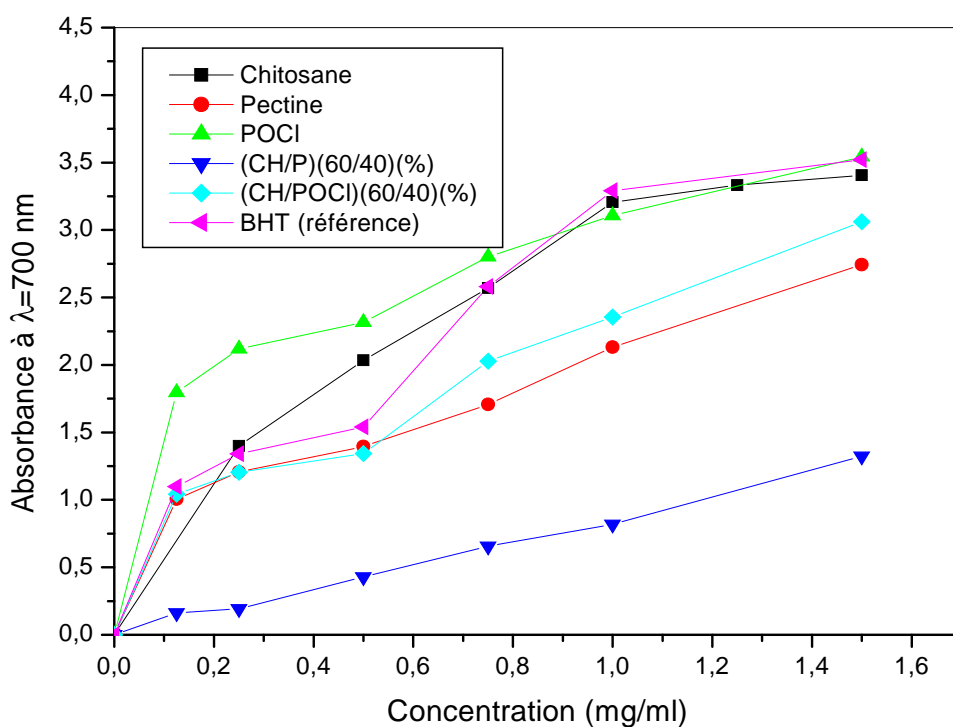


Figure III.3.14. Pouvoir réducteur des films à base du chitosane.

La présence des réductants dans les films de chitosane provoque la réduction de Fe^{3+} /complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, des Fe^{2+} peuvent être évalués en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (**Bougandoura, 2011**). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des composés testés (**Boussebaa, 2012**).

Nous avons déterminé la concentration IC₅₀ pour comparer l'activité réductrice de nos composés (mesure la capacité des produits à réduire les ions métalliques (fer ferrique en fer ferreux)), les résultats sont résumés dans le **tableau III.3.4**.

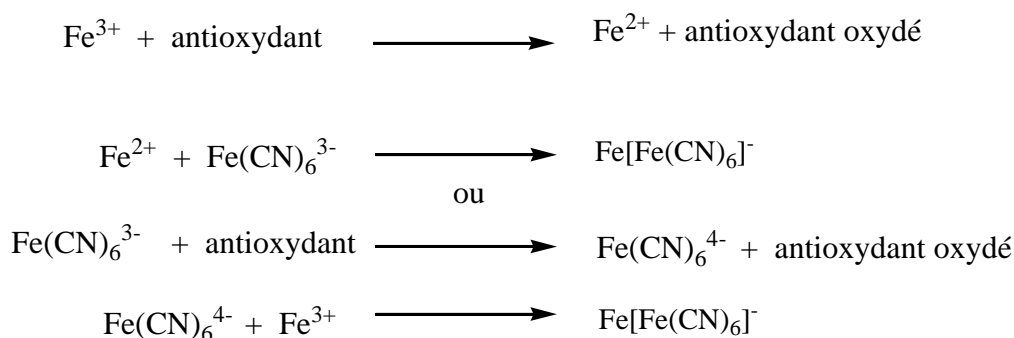
Tableau III.3.4. Valeurs de la concentration IC₅₀ des films.

Les échantillons	IC ₅₀ (mg/ml)
Chitosane	0,105
Pectine	0,060
POCl	0,040
(CH/P)(60/40)(%)	0,560
(CH/POCl)(60/40)(%)	0,054
BHT	0,059

Les concentrations IC₅₀ les plus faibles sont obtenues dans le mélange (CH/POCl) (60/40) (%) et le BHT à raison de 0,054, 0,059 mg/ ml, respectivement. Pour les autres formulations, les IC₅₀ sont à 0,105 et 0,560 mg/ ml pour le chitosane seul et le mélange (CH/P) (60/40) (%), respectivement.

Ces résultats permettent de déduire que le films de (CH/POCl)(60/40)(%) présente une meilleure activité antioxydante par rapport au chitosane et BHT.

La chimie des analyses fer peut être résumée avec l'équation suivante de réaction:



III.3.7. Activité antibactérienne :

Des travaux antérieurs menés par **Bindu *et al.*, (Bindu *et al.*, 2008)** ont révélé que le chitosane possède une activité antimicrobienne qui dépend de plusieurs facteurs à savoir le poids moléculaire, le pH, la température et le degré de désacétylation.

A ce propos, le degré de désacétylation élevé entraîne une action antibactérienne notamment sur *E. Coli* (**Liu *et al.*, 2001**). En l'occurrence, à 75% de désacétylation, le chitosane manifeste une meilleure inhibition aussi bien des Grams positifs que Grams négatifs par rapport à ceux désacétylés (**Park *et al.*, 2004**).

De plus, il a été démontré que l'activité antimicrobienne progresse avec le poids moléculaire du chitosane, d'une part.

D'autre part, la présence d'un agent antibactérien dans le chitosane améliore leur activité et notamment par rapport à ceux portés par la K- carraghénane et la méthyl cellulose (**Cha *et al.*, 2003**).

La majorité des études rapportées dans la littérature sur l'activité antimicrobienne du chitosane porte sur l'effet du poids moléculaire du chitosane ou sur l'effet de son degré de désacétylation (**Rabea *et al.*, 2003, Devlieghere *et al.*, 2004**).

Le mécanisme d'action antimicrobien du chitosane n'est pas encore bien connu mais différentes hypothèses ont été proposées (**Sudarshan *et al.*, 1992**). Les charges positives du chitosane peuvent interagir avec la charge négative des membranes de la cellule microbienne. Ce qui induit la libération du matériel protéique et les autres constituants intracellulaires. À de faibles concentrations, le chitosane polycationique se lie probablement à la surface des cellules chargées négativement causant ainsi leur agglomération. Par contre à des concentrations élevées, le grand nombre de charges positives va donner une charge positive nette à la surface des bactéries pour les garder en suspension. Le chitosane interagit avec la membrane des cellules pour altérer sa perméabilité par entrave à l'entrée de certains nutriments.

Dans notre cas, les résultats de l'activité antibactérienne sont résumés dans le **tableau III.3.5**.

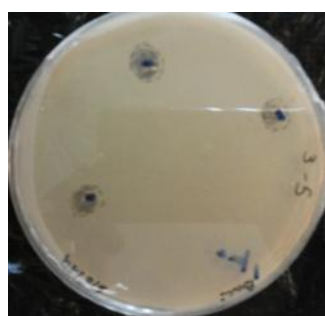
On note que:

- La pectine native montre la plus faible activité et particulièrement par rapport à celle oxydée par le chlore qui elle même est inférieure à celle oxydée par le periodate.
- Le chitosane possède une action meilleure que celle de la pectine à l'égard des quatre souches bactérienne étudiées.
- L'ajout de la pectine au chitosane (à 60/40%) entraîne une nette amélioration surtout sur la souche *Bacillus subtilis* où le diamètre d'inhibition dépasse celui de la gentamycine.
- Par contre, le chitosane additionné à la pectine oxydée par le chlore améliore l'action inhibitrice par rapport à celles de la pectine native et de la pectine oxydée par le chlore.
- Ainsi, chez le *Bacillus subtilis* et *E-coli*, l'inhibition est plus prononcée dans le cas du mélange chitosane/pectine et elle diminue avec le mélange du chitosane/pectine oxydée.

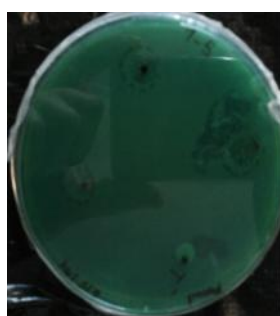
Tableau III.3.5. Diametre d'inhibition des films après t=24 h.

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Chitosane	12	11	10	11
Pectine	8	7	0	8
POP	10	10	9	11
POCl	9	9,6	8	9
(CH/P) (60/40)(%)	14	11	19	13
(CH/POP) (60/40)(%)	15	12	10	10
CH/POCl) (60/40)(%)	13	10	8	9
Amoxicilline	0	32	-	-
Gentamycine	-	-	18	-
Trim-sulfa	-	-	-	20

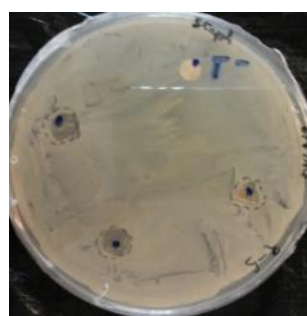
Chitosane



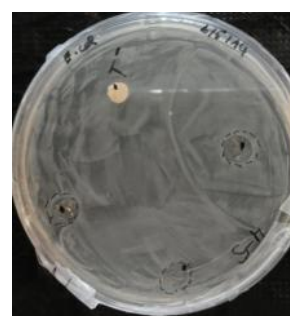
Bacillus subtilis



Pseudomonas aeruginosa

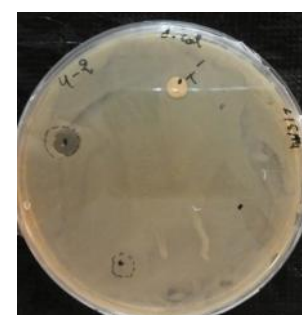
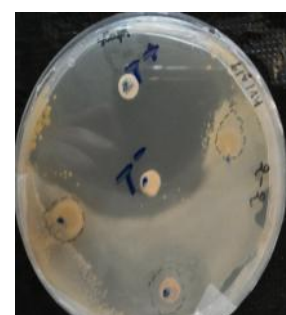
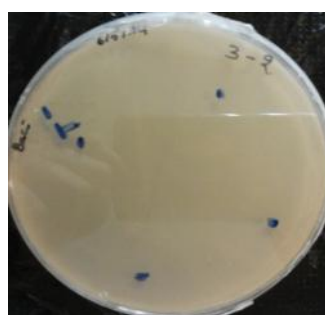


Staphylococcus aureus

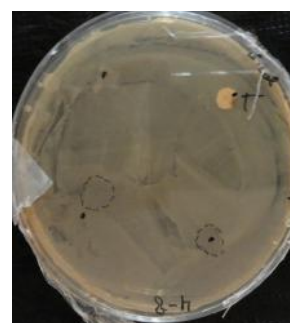
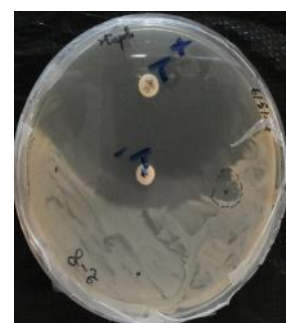
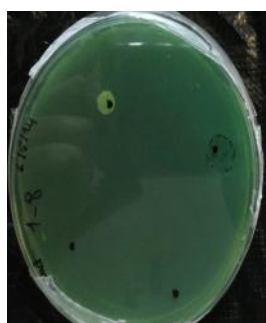
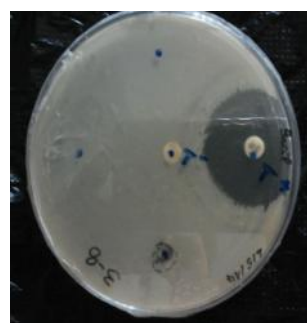


Escherichia coli

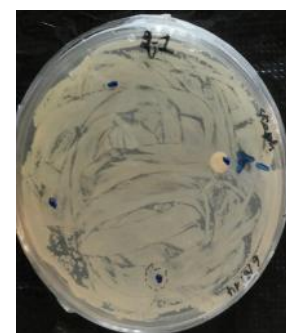
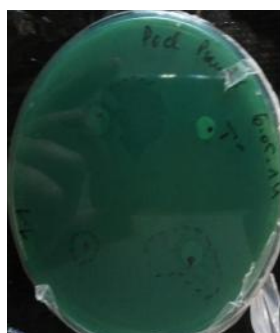
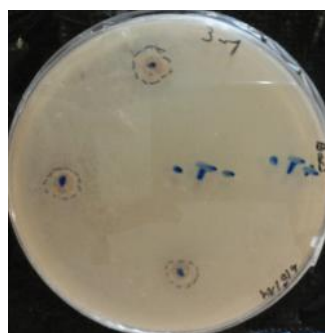
Pectine



POP



POCl



(CH/P)(60/40)(%)

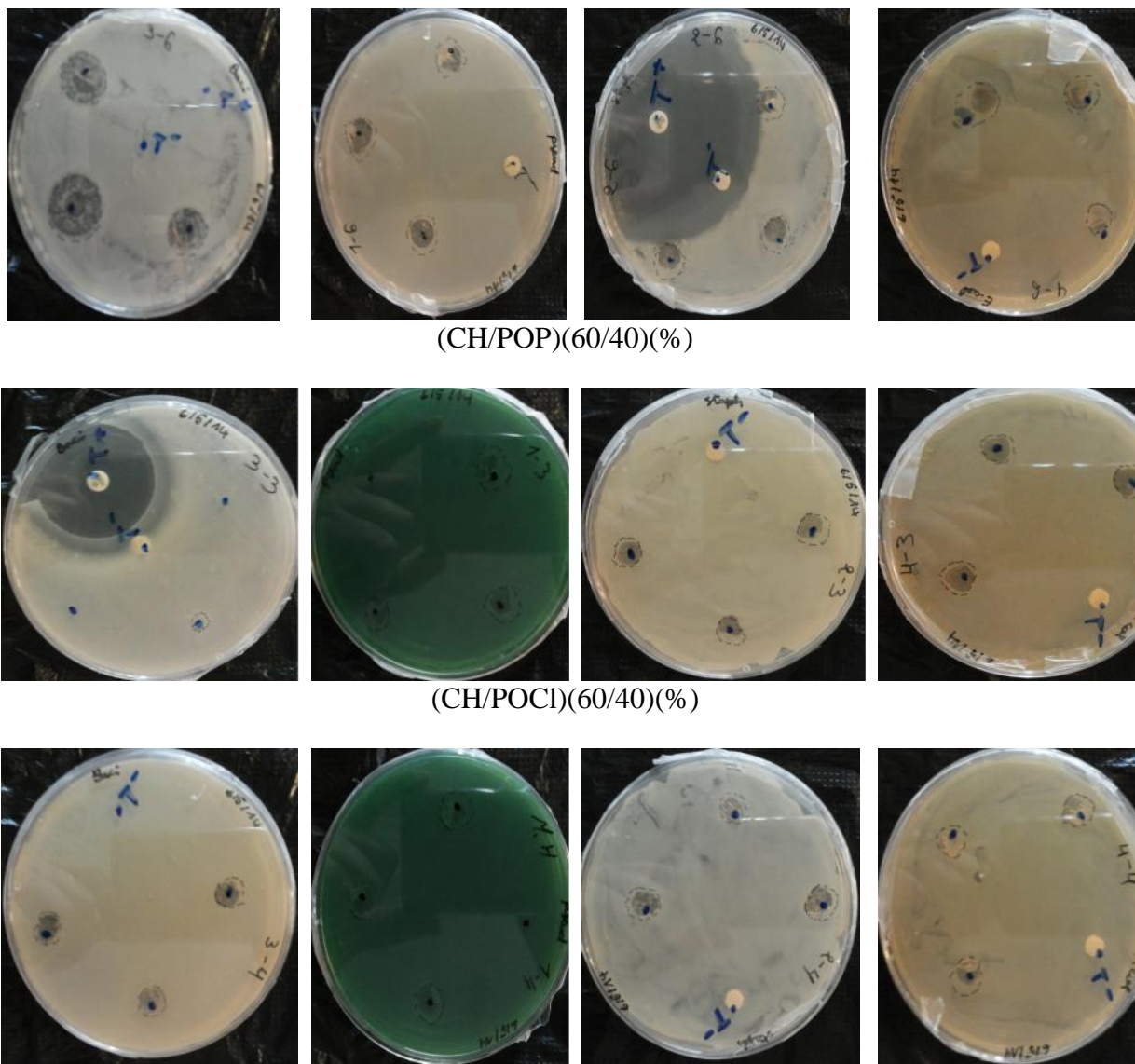


Figure III.3.15. Activité antibactérienne des films.

L'ensemble des travaux que nous avons présentés concerne l'étude de l'oxydation de la pectine par deux agents oxydants et la préparation des films à base de gélatine ou chitosane réticulés par les pectines oxydées ou par le glutaraldehyde.

Le dosage alcalin montre que la teneur des groupements carbonyles diminue, par contre les groupements aldéhydes et carboxyles augmentent avec la concentration de l'agent oxydant, l'hypochlorite de sodium.

En revanche, la quantité des carbonyles, aldéhydes et carboxyles augmente avec la concentration du periodate de sodium (NaIO_4).

La détermination du nombre des α -amino groupes présents dans la gélatine se fait selon la méthode de dosage par le TNBS, cette méthode nous permet aussi de calculer le taux de réticulation de la gélatine. Les résultats obtenus montrent que le taux de réticulation augmente avec la concentration des pectines oxydées et le glutaraldehyde.

Le dosage des protéines des différents films par BCA montre que la quantité des protéines augmente avec le temps. Dans le cas de la gélatine réticulée par le glutaraldehyde, la quantité des protéines est presque équivalente par rapport à celle qui est réticulée par les pectines oxydées. Ce qui confirme la réaction de réticulation.

La gélatine réticulée soit par les pectines oxydées ou le glutaraldehyde n'ont pas présenté des quantités de groupes amino, indiquant une réaction complète.

La spectrophotométrie IR-TF identifie la formation de nouvelles matrices. Des bandes caractéristiques aux amides et des imines sont mises en évidence suite aux réactions entre l'amine de (la gélatine et/ou chitosane) et l'acide carboxylique de la pectine oxydées par le chlore et l'amine avec l'aldéhyde de la pectine oxydée par le periodate de sodium ainsi des interactions physiques entre les charges positives NH_3^+ et COO^- de la pectine native sont formées.

La radiocristallographie par diffraction des rayons X a pu nous élucider que l'oxydation de la pectine entraîne une perte d'une manière progressive de la cristallinité qui se traduit soit par une diminution de certains pics, soit par leur disparition totale et que l'ossature en triple hélice de la gélatine diminue d'une manière progressive lors de l'ajout du polysaccharide et/ou l'agent réticulant. Des déplacements et disparitions des pics dans le cas du mélange chitosane/pectines oxydées nous indique probablement qu'il y a une interaction entre les deux biopolymères.

L'étude du gonflement dans des milieux pseudophysiologiques montre que la structure macroporeuse de la gélatine est la plus absorbante et que l'ajout des pectines oxydées conduit à des matrices deux à trois fois moins gonflantes par rapport à ceux de gélatine/pectine et que ces résultats sont comparables par rapport à la gélatine réticulée par le glutaraldehyde.

La solubilité des films à base de chitosane/pectines à $T=37^{\circ}\text{C}$ nécessite un temps dépassant 48h à l'exception du chitosane seul et le mélange à faible concentrations de pectines.

La biocompatibilité des films avec le sang est prometteuse pour leur future application.

Enfin, les films à base du chitosane possèdent une activité antioxydante et un effet antibactérien surtout à l'égard de gram positifs en présence de pectines oxydées.

A

Abdel-Hamida M. I., Khairou K. S., Hassan R. M.; **(2003)**; «Kinetics and mechanism of permanganate oxidation of pectin polysaccharide in acid perchlorate media». *European Polymer Journal*, 39, pp. 381–387.

Abdulwadud A., Muhammed T., Surajudeen A., Abubakar J. M., Alewo O. A. ; **(2013)** ; «Extraction and Characterisation of Chitin and Chitosan from Mussel Shell ». *Civil and Environmental Research*, 3 (2), pp. 108- 114.

Arguelles-Monal W., Cabrera G., Peniche C. & Rinaudo M.; **(2000)**; «Conductimetric study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and polygalacturonic acid». *Polymer*, 41, pp. 2373-2378.

Arnaud P. ; **(2004)**; « Chimie Organique ». *Éd. Duono*, France, pp. 423 – 578.

Aspinall G.O.; **(1970)**; «Polysaccharides». *2ème edition*, Pergamon press, Oxford, London.

B

Babak V., Lukina L., Vikhoreva G., Desbrieres L., Rinaudo M.; **(1999)**; «Interfacial properties of dynamic association between chitin derivatives and surfactants». *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 147, pp. 139 148.

Boanini E., Rubini K., Panzavolta S., Bigi A.; **(2010)**; « Chemico-physical characterization of gelatin films modified with oxidized alginate». *Acta Biomaterialia*, 6, pp. 383–388.

Babak V., Kildeyeva N. & Merkovich E.; **(2001)**; «The production of chitosane surfactant complex gel capsules for enzyme delivery», *Proceedings of the 28th International Symposium on controlled release of bioactive materials and 4 the consumer & diversified products conference*, San Diego, pp. 940-941.

Baldwin E.A., Nespros –carriedo M.O. & Baker R.A.; **(1995)**; «Use of edible coating to preserve quality of lightly (and slightly) processed product». *Food Science and Nutrition*, 35, pp. 509-523.

Beljit S. & Lok P.; **(2008)**; «Development of stercuria gum based wound dressings for use in drug delivery». *European Polymer Journal*, 44, pp. 3222-3230.

Benzeggouta N.; **(2005)**; «Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments». *Mémoire de Magister en Pharmacochimie*, Université Mentouri de Constantine.

Berand J. ; (2001) ; «Le technicien d'analyses biologiques», Guide théorie et pratique 2^{ème} éd., Tec et Doc, Paris.

Biji A., Cojazzi G., Panzavolta S., Rubini K. & Roveri N.; **(2001)**; «Mechanical and Thermal Properties of Gelatine Films at Different Degrees of Glutaraldéhyde Crosslinking». *Biomaterials*,.22, pp. 763-768.

Bubnis A.; **(1996)**; «Chemical and Swelling Evaluations of Amino Group Crosslinking in Gelatin and Modified Gelatine Matrices». 12, pp. 1821-1827.

Bonnin E., Dolo E., Le Goff A. & Thibault J.F.; **(2002a)**; «Characterisation of pectin subunits released by an optimized combination of enzymes». *Carbohydr. Res.*, 337, pp. 1687-1696.

Bonnin E., Saulnier L., Brunel M., Marot C., Lesage-Meessen L., Asther M., Thibault J.F.; **(2002b)**; «Release of ferulic acid from agroindustrial by-products by the cell wall-degrading enzymes produced by *Aspergillus niger*». *Enzyme Microb Technol.*, 31, pp. 1000-1005.

Belalia R.; **(2006)**; «Synthese d'une biocide par modification chimique de chitosane : Presentation du bois preservation des aliments ». *Thèse de doctorat*, université bordeaux I.

Bindu T. V. L., Vidyavathi M., Kavitha K., Sastry T. P., Suresh Kumar R. V.; **(2010)**; «Preparation and Evaluation of Chitosan-Gelatin Composite Films for Wound Healing Activity». *Trends Biomater. Artif*, 24(3), pp. 123-130.

C

Carunchio V., Girelli A., Messina A. & Sinibaldi M.; **(1987)**; «Chitosan-coated silica gel as a new support in high-performance liquid chromatography». *Chromatographia*, 23, pp. 731-735.

Centeno A.C., Marcelo I. G., Yamazakikleps A. & Della Vedova C. O.; **(2004)** ; «Characterisation by FTIR of the effect of lead white on some properties of proteinaceous binding media». *Journal of the American institute for conservation*, 43, pp. 139-150.

Chatjigakis A.K., Pappas C., Proxenia N., Kalantzi O., Rodis P., Polissiou M.; **(1998)**; «FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes». *Carbohydrate Polymers*, 37, pp. 395-408.

Challet F.; **(1999)**; «Biocompatibilité, Biodegradabilité et influence de la stérilisation sur le complexe-Xantane», *Thèse de maîtrise Es Science appliquées (M-SC-A) Polytechnique de Montréal*.

Crini G., Badot P.; **(2007)**; «Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies». *Prog. Polym. Sci.*, 33, pp. 399–447.

D

Degenis G.A., Gold T.B. & Shah V.P; **(1994)**; «Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro-in vivo performance», *Journal of Pharmaceutical Science*, 83(7), pp. 915-921.

Desbrières L., Rinaudo M., Babak V. & Vikhoreva G., **(1997)**; «Surface activity of water soluble amphiphilic chitin derivatives». *Polymer Bulletin*, 39, pp. 209-215.

Donato L.; **(2004)** ; «Gélification et séparation de phase dans les mélanges protéines globulaires/pectines faiblement méthylées selon les conditions ioniques », *Thèse de Doctorat en Sciences Alimentaires Université de Limoges*.

Draycott A. P.; **(2006)**; «Sugar beet»; 2^{ème} édition, blackwell publishing, Oxford, USA.

Dubois D. V.; **(2006)**; «Préparation de Peptides Antimicrobiens à partir de l'Hydrolyse Enzymatique de deux protéines : l'Hémoglobine Bovine et l' -Lactalbumine Bovine». *Thèse de doctorat*, Université des Sciences Techniques de Lille, pp. 49.

Dumville J.C. & Fry S.C.; **(2000)**; «Uronic acid-containing oligosaccharins: their biosynthesis, degradation and signalling roles in non-diseased plant tissues ». *Plant Physiol. Biochem.*, 38(1), pp. 125-140.

F

Fang N., Chan V., Mao H.Q. & Leong K.W.; **(2001)**; « Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH ». *Biomacromol.*, **2**, pp 1161-1168.

Fwu L. M. H. & Shin S. S.; **(2002)**; «Drug release from Chitosan Alginate complex beads reinforced by a naturally occurring crossing-linking agent». *Carbohydrate Polymers*, **48**, pp. 61-72.

Farris S., Jianhui S. & Qingrong H.; **(2010)**; «Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde». *J. of Agric.Food Chem*, **58**, pp. 998-1003.

Frantz le deveDEC; **(2008)**; « Séparation des oligomères du chitosane par chromatographie d'affinité sur ions métallique immobilisés». *Exigence partielle de la maitrise en chimie*, université du québec à montréal.

Fan L., Yi S., Weiguo X., Hua Z. & Shuhua L.; **(2012)**; «Oxidized Pectin Cross-Linked Carboxymethyl Chitosan: A New Class of Hydrogels». *Journal of biomaterials science*, **23**, pp. 2119-2132.

G

Goycoolea F., Arguelles-Monal W., Peniche C. & Higuera-Ciajara L.; **(2000)**; «Chitin and chitosan. Novel macromolecules in food systems». *Developments in food science*, **41**, pp. 265-308.

Gómez-Mascaraque L. G., Méndez J. A., Fernández-Gutiérrez M., Vázquez B. & San Román J.; **(2014)**; «Oxidized dextrans as alternative crosslinking agents for polysaccharides: application to hydrogels of agarose-chitosan». *Acta Biomater.*, **10**, pp. 798–811.

H

Hadwiger L.A., Chiang C., Victory S. & Horovitz D.; **(1989)**; «The molecular biology of chitosan in plant/pathogen interaction and its application in agriculture». *Chitin and chitosan*, New York, pp. 119-138.

Hari P.R., Chandy T. & Sharma C. P.; **(1996)**; «Chitosan/calcium-alginate beads for oral delivery of insulin». *Journal of Applied Polymer Science*, **59**, pp. 1795-1801.

Hesse M., Meter H. & Zeeh B.; **(1997)**; «Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique ». *Masson*, Paris, 2ème éd., pp.1- 48.

Hoffmann B., Seitz D., Mencke A., Kokott A. & Ziegler G.; (2009); «Glutaraldehyde and oxidised dextran as crosslinker reagents for chitosan-based scaffolds for cartilage tissue engineering». *Sci. Mater*, 20, pp. 1495–1503.

Huguet M.L., Groboillot A., Neufeld R. L., Poncelet D. & Dellacherie E.; (1994); «Hemoglobin encapsulation in chitosan/calcium alginate beads». *Journal of Applied Polymer Science*, 51, pp. 1427-1432.

I

Ishii T., Matsunaga T., Pellerin P., O'Neill M.A., Darvill A.G., Albersheim P.; (1999); «The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer». *J. Biol. Chem.*, 274, pp. 13098-13104.

J

Jinno K., Takayama K., (1989); «Separation of saccharides on cross linked chitosan beads with microcolumn liquid chromatography». *Journal of Microcolumn Separations*, 1, pp. 195-199.

Jackson C.L., Dreaden T.M., Theobald L.K, Tran N.M., Beal T.L., Eid M., Gao M.Y., Shirley R.B., Stoffel M.T., Kumar M.V. & Mohnen D.; (2007) ; «Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure». *Glycobiology*, 17, pp. 805-819.

Jessica D., Schiffman & caroline L.; (2007); «Cross-Linking chitosan nanofibers». *Biomacromolecules*, 8, pp. 594-601.

K

Kuakpetoon D., Wang Y. J.; (2001); «characterization of different starches oxidized by hypochlorite». *Food Science*, 53, pp. 211-218.

Kumar M.N.V.; Muzzarelli R.A.A.; Muzzarelli C; Sashiwa H.; Domb A.J.; (2004); «Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives». *Chem. Rev.*, 104, pp 6017-6084.

Koping H. M. T., Guan H.; Edwards K.; Nilsson M.; Varum K. M. & Artursson P.; (2001); «Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure property relationships and characteristics compared with polyethylenimine *in vitro* and after lung administration *in vivo*». *Gene Therapy*, 8, pp. 1108-1121.

Koping H.M.V., Issa M., Danielsen S., Christensen BE., Stokke B.T. & Artursson P. ; **(2004)** ; «Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan poly complexes of highly defined chitosan oligomers». *Gene Therapy*, 11, pp. 1441-1452.

Kirk O. & Eneyel C.; **(1967)**; «Pectic substances». *Chem. Technol*, 14, pp. 636- 651.

L

Liming Z.; **(2011)**; «Study on physico-chemical properties of dialdehyde yam starch with different aldehyde group contents». *Thermochimica Acta*, 512, pp.196–201.

Lundin L.; **(1993)**; «Binary polysaccharide system and phase separation mechanisms», A literature review, *SIK-report*, 591. Swedish Institute for Food and Biotechnology, Gotborg, Suède, pp. 368-370.

Laura G., Gomez M., José A.M., Mar F.G., Blanca V., Julio S.R.; **(2014)**; «Oxidized dextrans as alternative crosslinking agents for polysaccharides: Application to hydrogels of agarose-chitosan». *Acta Biomaterialia*, 10, pp. 798-811.

Lin L., Cao J., Huang J., Cai Y.; **(2010)** ; «Extraction of pectins with different degrees of esterification from mulberry branch bark ». *Bioresource Technology*, 101, pp. 3268–3273.

Lamarque G., Lucas JM., Viton C., Domard A. ; **(2005)**; «Physicochemical behavior of homogeneous series of acetylated chitosans in aqueous solution: role of various structural parameters». *Biomacromolecules*, 6, pp. 131-142.

M

Muzzarelli R. A. A.; **(1996)**; «Chitosan-based dietary foods». *Carbohydr. Polym*, 29, pp. 309-316.

Mishra R., Majeed A., Banthia A.; **(2011)**; « Development and characterisation of pectin/gelatin hydrogel membranes for dressing », *International Journal of Plast Technol.*, 15(1), pp. 82-95.

Muzzarelli. R. A. A., Muzzarelli. B.; **(1998)**; «Structural and functional versatility of chitins», *Marcel Dekker, Inc.* New York, pp. 569-594.

May C. D.; **(1990)**; «Industrial Pectins: Sources, Productions and applications». *Carbohydrate Polymers*, 12, pp. 79-99.

Munarin F, Paola P, Maria C., Tanzi M, Barbosabcd A, Pedro L.G.; **(2012)**; «Biofunctional chemically modified pectin for cell delivery». *Soft Matter*, 8, pp. 4731-4739.

Migneault I. & Dartiguenave C.; **(2004)**; «Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking». *BioTechniques*, 37, pp. 790-802.

Monarul M. I., Shah M. M., Mahbubur M. R., Ashraful M. M., Shaikh A. A., Roy S. K. ; **(2011)** ; «Preparation of chitosane from shrimp Shell and investigation of its properties». *International journal of basic & applied sciences*, 11 (1), 77-80.

N

Naggar, V.F., EL-Khawas M. ; Ismail F. A. ; Boraie N. A. ; **(1992)** ; «Pectin, a possible matrix for oral sustained-release preparations of water-soluble drugs». *STP Pharma Sciences*, 2, pp. 227-234.

O

Ofner C.M. & Bubnis W.A; **(1992)**; «The Determination of Amino Groups in Soluble and Poorly Soluble Proteinaceous Materials by a Spectrophotometric Method Using Trinitrobenzensulfonic acid». *J. Analytical Biochemistry*, 207, pp. 129-133.

Ofner C.M., Bubnis W.A.; **(1996)**; «Chemical and Swelling Evaluations of Amino Group Crosslinking in Gelatin Matrices». *J. Pharm res.*, 13, pp. 1821-1827

P

Peniston Q. P.; Johnson E.; **(1980)**; «Process for the Manufacture of Chitosan». *US Patent*. 4, pp. 195,175.

Peniche-Covas C., Alvarez W., Argüelles Monal W.; **(1992)**; «The adsorption of mercuric ions by chitosane». *Journal of Applied Polymer Science*, 46, pp. 1147- 1150.

Pesnel G., Squinazi F., Lemerle-Gruson S., Lassale C., Geslin P., Reinert P.; **(1983)**; «Diffusion méningée de l'amoxicilline intraveineuse». *Medecine et Maladies Infectieuses*; 13, pp. 300-304.

Peroglio M.; **(2008)**; «Composite organiques-inorganiques poreux pour la substitution osseuse». *Thèse de doctorat*, INSA, Lyon. pp. 96-106.

Perrone P., Hewage CM., Thomson AR., Bailey K., Sadler IH., Fry SC. ; **(2002)**; «Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: new complexity». *Phytochemistry*, 60, pp. 67-77.

Pal K., Ajit K. & Dipak K.; **(2007)**; «Preparation and Characterization of Polyvinyl Alcohol–Gelatin Hydrogel Membranes for Biomedical Applications». *PharmSciTech* , 8, pp. 21-75.

Pranati S. and Rishabha M.; **(2011)**; «Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry– an overview». *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2, pp. 10-18.

R

Rinaudo M., Pavlov G. & Desbrières J.; **(1999)**; «Influenced of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan». *Polym.* 40, pp. 7029-7032.

Rodrigo S., Vieira, marisa M., Beppu; **(2006)**; «Interaction of natural and crosslinked chitosan membranes with Hg (II) ions». *Physicochem*, 279, pp. 196-207.

Rhazi M., Desbrières L., Tolaimate A., Rinaudo M., Vottero P., Alagui A.; **(2002)**; «Contribution to the study of the complexation of copper by chitosan and oligomers». *Polymer*, 43, pp. 1267-1276.

Redriguez J.; **(2008)**; «Oxydation de matériel lignocellulosique par le système NaOCl/NiO(OH) », *thèse de Doctorat*. Université du Québec à Trois-Rivières.

Ralet M. C., Bonin E., Thibault J.F., Steinbüchel A.; **(2002)**; «Pectins, Polysaccharides II». *Biopolymers*, 8 (12), pp. 345-380.

Ralet M.C., Cabrera J.C., Bonnin E., Quémener B., Hellin P., Thibault J.F.; **(2005)**; «Mapping sugar beet pectin acetylation pattern». *Phytochemistry*, 66, pp. 1832-1843.

Rees D. A.; **(1970)**; «Structure, conformation and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks». *In advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 24, pp. 267-332.

Ridley B. L., O'Neill M. A. & Mohnen D.; **(2001)**; «Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling». *Phytochemistry*, 57, pp. 929-967.

S

Samake D.; **(2008)**; «Traitement des eaux usées de tannerie à l'aide de matériaux à base d'argile». *Thèse de Doctorat*. Université Bamako.

Srivastava P., Malviya R., Kulkarni G. T.; **(2010)**; «Formulation and Evaluation of paracetamol tablets to assess binding property of orange peel pectin», *Int. J Pharma. Sci. Review and Research*, 3, pp. 30-34.

Sudha P.N., Raghunadh A., Gomathi T.; **(2013)**; «Physico-chemical characterisation of cross linked chitosan-polyacrylonitrile polymer blends». *Der Pharmacia Lettre*, 5(2), pp. 354-363.

Synytsya A. J., opikova C., Matejka P., Machovic V.; **(2003)**; « Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins ». *Journal of Carbohydrate Polymers*, 86, pp. 97–106.

Schacht E., Draye J. P. & Delaey B.; **(2000)**; «Medicaments Containing Gelatine Crosslinked with Oxidized Polysaccharides». *United States Patent*, 6, pp. 132-759.

Song K.W.; «Study on Gelatin Containing Artificial Skin». **(1999)**; *J. of Biomaterials*, 20, pp. 409-417.

Sandford P.; **(1989)**; «Chitosan: commercial uses and potential applications». *Sources, Chemistry, Biochemistry. Physical Properties and Applications. Elsevier Applied Science*, pp. 51–69.

Strand S. P., Danielsen S., Christensen B. E. & Varum K. M. ; **(2005)** ; «Influence of Chitosan Structure on the Formation and Stability of DNA-Chitosan Polyelectrolyte Complexes». *Biomacromolecules*, 6, pp. 3357-3366.

Shahidi F., & Abuzaytoun R.; **(2005)**; «Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, productions, applications, and health effects». *Adv. Food Nutr. Res.*, 49, pp.93-135.

Sarath S. M., Basavaraj B. V., Bharath S., Deveswaran R. & Madhavan V.; **(2011)**; «Formulation and evaluation of ibuprofen tablets using orange peel pectin as binding agent». *Der Pharmacia Lett.*, 3, pp. 241-247.

T

Tang P.Y., Wong C. J. and Woo K. K.; **(2011)**; «Optimization of Pectin Extraction from Peel of Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*)». *Asian Journal of Biological Sciences*, 4, pp. 189-195.

Thakur B. R., Singh R. K., Handa A. K.; **(1997)**; «Chemistry and uses of pectin a review». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, pp. 47-73.

Thibault J. F. ; **(1980)**; «Les pectines, Dans : Les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés», *Ed Gauthier-Villars*, Paris, pp. 232-251.

V

Varum K. M.; Ottoy M. H.; Smidsrod O.; **(1994)**; «Water-solubility of parti ail y N-acetylated chitosans as a function of pH: effect of chemical composition and depolymerisation». *Carbohydr. Polym.*, 25, pp. 65-70.

Vasiliu S., Popa M., Rinaudo M.; **(2005)**; «Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers». *European Polymer Journal*, 41, pp. 923-932.

Voragen A. G. J., Pilnik W., Thibault J. F., Axelos M. A. W., Renard C. M. G.; **(1995)**; «Pectins». *Food polysaccharides*, 3, pp. 287-339.

Y

Yaung; S.C.; **(1999)**; «Studies on Gelatin-Containing Artificial Skin: II. Preparation and Characterization of Cross-Linked Gelatin-Hyaluronanate Sponge». *J. of Biomedical Materials Research*, 48, pp. 631-639.

Yakimets I., Wellner N. & Andrew C. S.; **(2005)**; «Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state». *Polymer* , 46, pp. 12577–12585.

Z

Zhanga Y., Zhanga, X., Dinga R., Zhanga J. & Liub J.; **(2011)**; «Determination of the degree of deacetylation of chitosan by potentiometric titration preceded by enzymatic pretreatment». *Carbohydrate Polymers*, 83, pp. 813–817.

Résumé

L'étude des interactions chimique et physique entre la pectine avant et après son oxydation est réalisée en présence de la gélatine et/ou le chitosane. L'oxydation de la pectine est obtenue par action de l'hypochlorite de sodium ou du periodate de sodium. De nouveaux groupements carbonyles voire des carboxyles sont formés et quantifiés. Trois méthodes de dosages ont été suivies à savoir la méthode par l'hydroxylamine et deux acido-basiques. La caractérisation de des différents matériaux est faite par IR-TF et DRX. Les tests de solubilité et du gonflement dans des milieux physiologiques, la détermination des amino-groupes libres, le dosage des protéines par l'acide Bicinchoninique (BCA), le calcul des nombres de moles des -amino groupes et l'évaluation du taux de réticulation par le TNBS sont étudiés. Aussi, la biocompatibilité des hydrogels avec le sang humain est estimée. Et enfin, les activités antibactérienne et antioxydante sont établies.

Les mots clés : Pectine, oxydation, gélatine, chitosane, propriétés physico-chimiques, activités antibactérienne et antioxydante.

Summary:

The study of chemical and physical interaction between pectin before and after its oxidation is carried out with gelatin and/or chitosan. The oxidation of pectin is obtained from action of sodium hypochlorite or sodium periodate. Carbonyl and carboxyl groups which are formed are quantified following the method using hydroxylamine and by two acido-basic essays. The characterization of new materials is made by FTIR and XRD. The test of solubility and swelling in physiological mediums, the determination of the free amino-groups, the ratio of proteins by the acid Bicinchoninique (BCA) method, the number of mole of the -amino groups and the evaluation of the reticulation by TNBS are studied. Also, the biocompatibility of hydrogels with human blood is estimated. And finally, the antibacterial and antioxidant activities are established.

Key words: Pectin, oxidation, glatin, chitosan, chemical and physical properties, activités antibactériel and antioxidant activities.

Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrai témoigner toute ma reconnaissance.

Je voudrai tout d'abord adresser toute ma gratitude à la directrice de ce mémoire,

***Mme EL KOLLI MERBAH MERIEM**, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.*

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à mon Co-encadreur

***Melle CHETOUANI ASMA**, à qui j'exprime ma gratitude pour sa gentillesse, ainsi que pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle m'a consacrés.*

*Mes remerciements vont également à **Monsieur OUARI KAMEL**, Mon professeur, qui me fait un grand honneur en acceptant de présider le jury de ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à **Madame BOURAS KARIMA**, pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Je tiens à remercier tous mes camarades du laboratoire : **SARA, HADJER, KHADIJA, ZAHRA** et **SAIDA** pour la bonne humeur et les bons moments passés ensemble.*

Je n'oublie pas de dire Merci également à l'ensemble du Personnel du Laboratoire de la Microbiologie de l'Université de Sétif-1 d'El-bez et d'électrochimie de l'Université de Bejaïa.

SOMMAIRE

Sommaire.....	<i>i</i>
Liste des figures.....	<i>vi</i>
Liste des tableaux	<i>ix</i>
Liste d'abréviation	<i>iy</i>
Glossaire	<i>iz</i>
Introduction générale.....	01

Chapitre I: Les biopolymères

I.1. La pectine.....	03
I.1.1. Description des pectines et leurs origines.....	03
I.1.2. Extraction.....	04
a) Extraction de pectine de pomme.....	04
b)Extraction de pectine de citron et/ou d'orange.....	05
c)Extraction de pectine de betterave.....	06
I.1.3.Propriétés physico-chimiques.....	06
a) Masse moléculaire.....	06
b) Solubilité et précipitation.....	07
c) Propriétés gélifiantes et stabilisantes.....	07
d) Propriétés viscosifiantes.....	07
I.1.4. Structure.....	08
➤ Xylogalacturonanes.....	08
➤ Arabinanes.....	08
➤ Galactanes.....	09

➤ Arabinogalactanes.....	09
➤ Homogalacturonane.....	10
➤ Rhamnogalacturonane type I.....	10
➤ Rhamnogalacturonane type II.....	12
I.1.5. Réactions d'oxydation.....	13
• Par le periodate de potassium.....	1.3
• Par le permanganate.....	14
I.1.6. Application.....	14
I.1.6.1. Pectine dans la nutrition et l'industrie alimentaire.....	14
I.1.6.2. Pectine dans la médecine et l'industrie pharmaceutique.....	15
I.2. Chitine et chitosane.....	16
I.2.1. Chitine.....	16
I.2.2. Structure chimique.....	17
I.2.3. Degré de déacétylation.....	18
I.3. Chitosane.....	18
I.3.1. Extraction.....	18
I.3.2. Propriétés complexantes.....	19
➤ Complexes avec les ions métalliques.....	19
I.3.3. Caractérisation.....	20
a) La solubilité.....	20
b) Complexes électrostatique.....	22
➤ Interactions avec le surfactant.....	22
➤ Interactions avec diverse polyélectrolytes.....	22
I.3.4. Dérivés du chitosane.....	23

I.3.5. Applications du chitosane et chitine.....	24
--	----

Chapitre II : Partie expérimentale

II.1. Matériels.....	26
II.2.Méthodes.....	27
II.2.1. Titrage indirect de l'eau de javel.....	27
II.2.1.1 Préparation de différents pourcentages en chlore actif	28
II.2.2. Oxydation de la pectine par l'eau de javel (NaOCl).....	28
II.2.3. Oxydation de la pectine par le periodate de sodium (NaIO ₄).....	29
II.2.4. Dosages chimiques.....	29
II.2.4.1. Détermination de la teneur en carbonyle (1ère méthode).....	29
II.2.4.2. Détermination de la teneur en groupements aldéhydes (2ème méthode)....	30
II.2.4.3. Détermination de la teneur en carboxyle.....	30
II.2.5. Préparation des films à base du chitosane additionné à la pectine et/ou pectines oxydées.....	31
II.2.5.1. Préparation des films solubilisés dans l'acide chlorhydrique.....	31
II.2.5.2. Préparation des films solubilisés dans l'acide lactique.....	32
II.2.6. Préparation des films à base de gélatine additionnée à la pectine et/ou pectine oxydée.....	32
II.2.7. Spectrophotométrie infrarouge (IR-TF).....	33
• Principe.....	33
• Appareil.....	34
II.2.8. Radiocristallographie par diffraction des rayons X (DRX).....	34
• Principe.....	34

• Appareil.....	35
II.2.9. Test de solubilité et mesure de la turbidité.....	35
II.2.10. Tests de gonflement.....	36
II.2.11. Détermination des amino-groupes libres.....	37
II.2.12. Dosage des protéines par l'acide Bicinchoninique (BCA).....	37
a) Courbe d'étalonnage.....	37
b) Dosage des protéines libérés.....	39
II.2.13. Détermination du nombre de moles des -amino groupes et évaluation du taux de réticulation par le TNBS.....	40
II.2.14. Biocompatibilité des films avec le sang humain.....	41
II.2.15. Activité antioxydante.....	42
II.2.15.1. Test de DPPH	42
II.2.15.2. Pouvoir réducteur	42
II.2.15. Activité antibactérienne.....	43
• Bactéries.....	43
• Amoxicilline.....	43
• Gentamicine.....	44
• Triméthoprim / sulfaméthoxazole (Trim-sulfa).....	44
• Préparation du milieu de culture.....	45
• Souches bactériennes et milieux de culture.....	46
• Ensemencement.....	46

Chapitre III: Résultats et discussions

Partie 1: OXYDATION DE LA PECTINE

III.1.1. Oxydation par l'hypochlorite de sodium.....	48
III.1.1.1 Titrage indirect de l' eau de Javel.....	48
A. Quantité de matière n (I_2) de diiode formé.....	48
B. Quantité de matière n (ClO^-) d'ions hypochlorite contenu dans la solution.....	49
C. Détermination du degré chlorométrique.....	49
D. Valeur du degré chlorométrique.....	50
III.1.1.2. Teneur en carbonyle et en carboxyle.....	50
III.1.1.3. Spectroscopie IR-TF.....	51
III.1.2. Oxydation par le periodate de sodium.....	53
III.1.2.1. Teneur en carbonyle et en carboxyle.....	53
III.1.2.2. Spectroscopie IR-TF.....	56
III.1.3. DRX des pectines avant et après oxydation.....	58

Partie 2: Caractérisation des nouveaux matériaux à base de GELATINE

III.2.1. Degré de réticulation.....	60
III.2.2. Détermination du nombre de moles des -amino groupes et évaluation du taux de réticulation par le TNBS.....	60
III.2.3. Dosage des protéines par l'acide Bicinchoninique (BCA).....	63
III.2.4. Spectroscopie IR-TF.....	66
➤ Gélatine	66
➤ Mélange gélatine/pectine (60/40) (%).....	67
➤ Gélatine réticulée par les pectines oxydées et/ou le glutaraldehyde.....	68

III.2.5. Diffraction des rayons X.....	73
III.2.6. Test de gonflement.....	75
III.2.7. Evaluation de la compatibilité avec le sang.....	83
Partie 3: Caractérisation des nouveaux matériaux à base du CHITOSANE	
III.3.1. Degré de reticulation.....	84
III.3.2. Spectroscopie infrarouge IR-TF.....	85
➤ Le chitosane.....	85
➤ Mélange (chitosane/pectine) (60/40) (%)	86
➤ Chitosane réticulé par les pectines oxydées et/ou le glutaraldehyde.....	87
➤ Chitosane solubilisé dans l'acide lactique.....	92
III.3.3. Diffraction des rayons X	93
➤ Le chitosane solubilisé dans l'HCl.....	93
➤ Le chitosane solubilisé dans l'acide lactique.....	94
III.3.4. Mesure de la turbidité par la D.O à 600nm.....	95
III.3.5. Evaluation de la compatibilité avec le sang.....	96
III.3.6. Activité antioxydante.....	97
III.3.6.1. Activité antioxydante par la méthode du DPPH.....	97
➤ Détermination quantitative du pouvoir antiradicalaire.....	97
III.3.6.2. Activité antioxydante par la méthode du réduction de fer.....	101
III.3.7. Activité antibactérienne.....	103
Conclusion.....	107
Références bibliographiques.....	109
Annexe.....	119

Figure I.1. Schéma d'extraction de la pectine	5
Figure I.2. Modèle structural du squelette Xylogalacturonane	8
Figure I.3. Séquence primaire des arabinanes	9
Figure I.4. Séquence primaire des galactanes	9
Figure I.5. Séquence primaire des arabinogalactanes de type I (AG-I).....	9
Figure I.6. Séquence primaire des arabinogalactanes de type II (AG-II).....	10
Figure I.7. Structure primaire d'un homogalacturonane.....	10
Figure I.8. Structure d'un rhamnogalacturonane I	11
Figure I.9. Structure primaire du rhamnogalacturonane II avec quatre chaînes latérales de structure différente (A-D)	12
Figure I.10. Oxydation de la pectine par l'ion permanganate	13
Figure I.11. Oxydation de l'amidon par l'hypochlorite de sodium	15
Figure I.12. La chitine est le constituant principal de l'exosquelette A) des insectes et B) des crustacés	17
Figure I.13. Structure chimique de la chitine.....	17
Figure I.14. Structures proposées du complexe entre cuivre (II) et le chitosane	21
Figure I.15. Exemples de dérivés chimiques du chitosane	24
Figure II.1. Courbe d'étalonnage pour la détermination de protéines libérées à partir des films de (G/pectine) et (G/pectine oxydée).....	41
Figure II.2. réaction de l'acide 2, 4, 6-trinitrobenzène sulfonique avec les groupements amino-protéines en milieu alcalin.....	41
Figure III.1.1. Histogramme résumant les valeurs des teneurs en carbonyles et carboxyles.....	51
Figure III.1.2. Spectres IR-TF de la pectine (a), pectines oxydées à 0,25% (b), PO à 0,75% (c), PO à 1,5% (d), PO à 3 % (Cl ₂ actif) (e).....	52

Figure III.1.3. Conversions les plus probables de la pectine suite à son oxydation par l'hypochlorite de sodium.....	53
Figure III.1.4. Histogramme résumant les valeurs des teneurs en carbonyles et carboxyles.....	55
Figure III.1.5. Spectres IR-TF dans le KBr de la pectine (a) , la pectine oxydée pendant t=4h (b)	56
Figure III.1.6. Première étape du mécanisme d'oxydation des alcools pinacoliques par le periodate de sodium.....	57
Figure III.1.7. Mécanisme concerté de l'intermédiaire réactionnel cyclique à 5 chaînons.....	58
Figure III.1.8. Représentation schématique de l'oxydation de la pectine par le periodate.....	58
Figure III.1.9. Diffractogrammes de la pectine et la pectine oxydée (0,25; 0,75; 1,5; 3) (%) du Cl actif.....	59
Figure III.1.10. Diffractogramme de la pectine et la pectine oxydée par le [KIO ₄] à t=4 h.....	59
Figure III.2.1. pH titration de gélatine et gélatine réticulée par le glutaraldehyde ou pectines oxydées.....	60
Figure III.2.2. Histogramme représentant le degré de réticulation de différentes formulations.....	61
Figure III.2.3. Histogramme représentant -amino groupes (mole/gramme de gélatine) de différentes formulations.....	62
Figure III.2.4. La concentration de protéines libérées en fonction du temps.....	65
Figure III.2.5. Spectre IR-TF du film de la gélatine.....	67
Figure III.2.6. Spectres IR-TF des films de a) gélatine, b) (G/P) (60/40)(%), c) (G/POP)(60/40)(%), d) (G/POCl)(60/40)(%) et e) (G/GTA)(100/02)(%).....	69

Figure III.2.7. Modifications structurales possibles du glutaraldéhyde en fonction du pH (Migneault <i>et al.</i> , 2004).....	71
Figure III.2.8. Mécanisme réactionnel entre les amino groupes du GTA pour former la base de Schiff.....	72
Figure III.2.9. Diffractogrammes de la gélatine, (G/P) (60/40) (%), (G/POCl) (60/40) (%) et (G/POP) (60/40) (%).....	75
Figure III.2.10. Variation du taux de gonflement (%) des différents films à une T_{amb} en fonction du temps dans l'eau distillée : a) (G/P) (%), b) (G/POP) (%) et c) (G/POCl) (%).....	77
Figure III.2.11. Variation du taux de gonflement (%) des différents films à une T_{amb} en fonction du temps dans l'eau distillée : a) (G/P) (95/05) (%), b) (G/P) (60/40) (%), c) (G/POCl) (40/60) (%) et (G/GTA) (98/02) (%).....	78
Figure III.2.12. Variation du taux de gonflement (%) des différents films à une T_{amb} en fonction du temps dans l'eau distillée : a) (G/P) (95/05) (%), b) (G/P) (60/40) (%), c) (G/POCl) (40/60) (%) et (G/GTA) (98/02) (%).....	79
Figure III.2.13. Variation du taux de gonflement (%) des différents films à une T_{amb} en fonction du temps dans un pH=7,4 : a) (G/P)(95/05)(%)(%), b) (G/P)(60/40)(%), c) (G/POCl)(40/60)(%) et (G/GTA)(100/02)(%).....	80
Figure III.2.14. Variation du taux de gonflement (%) des différents films à une T_{amb} en fonction du temps dans un pH=8,2: a) (G/P)(%), b) (G/POP)(%) et c) (G/POCl)(%).....	81
Figure III.2.15. Variation du taux de gonflement (%) des différents films à une T_{amb} en fonction du temps dans un pH=8,2: a) (G/P)(95/05)(%)(%), b) (G/P)(60/40)(%), c) (G/POCl)(40/60)(%) et (G/GTA)(100/02)(%).....	82
Figure III.2.16. Essais de compatibilité avec le sang.....	83
Figure III.3.1. pH titration du chitosane et chitosane réticulé par le glutaraldéhyde ou pectines oxydées dans les 2 milieux «HCl (a) et Acide lactique (b)».....	84

Figure III.3.2. Spectre IR-TF du film de chitosane.....	85
Figure III.3.3. Spectres infrarouge du chitosane (a), de la pectine (b) et du mélange (CH/P) (60/40) (%) (c).....	87
Figure III.3.4. Spectres infrarouge du chitosane (a), de la pectine oxydée par le periodate (b) et de (CH/POP) (60/40) (%) (c).....	88
Figure III.3.5. Spectres infrarouge du chitosane (a), de la pectine oxydée par le chlore actif (b) et de (CH/POCl) (60/40) (%) (c).....	89
Figure III.3.6. Spectres infrarouge du chitosane (a), de (CH/GTA) (100/02) (%) (b)...	90
Figure III.3.7. Spectres IR-TF du l'acide lactique: a) chitosane, b) (CHP) (60/40) (%), c) (CH/POP) (60/40) (%), d) (CH/POCl) (60/40) (%) et e) (CH/GTA) (100/02) (%).....	93
Figure III.3.8. Diffractogrammes des rayons X du chitosane; (CH/P) (60/40) (%), (CH/POCl) (60/40) (%) et (CH/POP) (60/40) (%) solubilisé dans l'HCl.....	94
Figure III.3. 9. Diffractogrammes des rayons X du chitosane; (CH/P) (60/40) (%), (CH/POCl) (60/40) (%) et (CH/POP) (60/40) (%) solubilisé dans l'acide lactique.....	94
Figure III.3.10. Structure du 2,2- diphényl-2-picryl-hydrazyle et sa forme réduite.....	98
Figure III.3.11. Spectre UV-VIS du DPPH.....	98
Figure III.3.12 Pourcentage d'inhibition en pourcent en fonction de la concentration des composés.....	101
Figure III.3.13. IC ₅₀ des films à base de chitosane et du BHT.....	99
Figure III.3.14. Pouvoir réducteur des films à base du chitosane.....	101
Figure III.3.15. Activité antibactérienne des films.....	106
Figure A.1. Spectres IR-TF de glutaraldehyde (source de base : SDBS).....	119
Figure A.2. Spectres IR-TF de l'acide lactique (source de base : SDBS).....	120

Figure. A.3. Photo représentant le test de solubilité dans l'eau distillée à t=2h et T= 25°C.....	121
Figure. A.4. Photo représentant le test de solubilité dans l'eau distillée à t=48h et T= 25°C.....	122
Figure. A.5. Photo représentant le test de solubilité dans un l'eau distillée à t=2h et T= 37°C.....	123
Figure. A.6. Photo représentant le test de solubilité dans l'eau distillée à t=48h et T= 37°C.....	124
Figure. A.7. Photo représentant le test de solubilité dans un pH=7.4 à t=2h et T= 25°C.	125
Figure. A.8. Photo représentant le test de solubilité dans un pH=7.4 à t=48h et T= 25°C.....	126
Figure. A.9. Photo représentant le test de solubilité dans un pH=7.4 à t=2h et T= 37°C.	127
Figure. A.10. Photo représentant le test de solubilité dans un pH=7.4 à t=48h et T= 37°C.....	128
Figure. A.11. Photo représentant le test de solubilité dans un pH=8.2 à t=2h et T= 25°C.....	129
Figure. A.12. Photo représentant le test de solubilité dans un pH=8.2 à t=48h et T= 25°C.....	130
Figure. A.13. Photo représentant le test de solubilité dans un pH=8.2 à t=2h et T= 37°C.....	131
Figure. A.14. Photo représentant le test de solubilité dans un pH=8.2 à t=48h et T= 37°C.....	132

Tableau I.1. Principales sources de pectines d'intérêt industriel.....	4
Tableau I.2. Composition de formulation des pectines.....	6
Tableau I.3. Sources potentielles de chitine.....	19
Tableau I.4. Quelques propriétés et applications des gels de chitosane.....	25
Tableau II.1. Degré chlorométrique, % Chlore actif et gramme de Cl actif par L.....	29
Tableau II.2. Les volumes précis du BSA et la solution «w» pour préparer la courbe d'étalonnage.....	39
Tableau II.3. Composants du Gélose Muller – Hinton.....	46
Tableau III.1.1. Etat d'avancement pour déduire la quantité n (ClO⁻) d'ions hypochlorites contenus dans la prise d'essai.....	49
Tableau III.1.2. Résultats du dosage des groupes carbonyles et des groupements carboxyliques.....	50
Tableau III.1.3. Résultats du dosage des groupes carbonyles et des groupements carboxyliques.....	55
Tableau III.2.1. Tableau représentant le nombre de moles des -amino groupes et les degrés de réticulation des différents films.....	61
Tableau III.2.2. Estimation de la concentration de protéines libérées en fonction du temps.....	63
Tableau III.2.3 Diamètre inter-réticulaire et la teneur en triple hélice de la gélatine, (G/P) (60/40) (%), (G/POCl) (60/40) (%) et (G/POP) (60/40) (%).....	74
Tableau III.2.4. Valeurs des G_{max} des différentes compositions des films de gélatine, (gélatine /pectine) et (gélatine /pectines oxydées).....	76
Tableau III.2.4. Potentiel hémolytique des hydrogels.....	83
Tableau III.3.1. La turbidité des différents échantillons à T=25°C.....	95
Tableau III.3.2. Potentiel hémolytique des hydrogels.....	96
Tableau III.3.3. Les valeurs des IC50 des différents composés.....	99
Tableau III.3.4. Valeurs de la concentration IC50 des films.....	102
Tableau III.3.5. Diamètre d'inhibition des films après t=24 h.....	104

Liste d'abréviation

POP: pectine oxydé par le periodate de sodium;

POCl: pectine oxydé par l'hypochlorite de sodium;

DA : degré d'amidation;

DO : densité optique;

BHT: Butylated hydroxytoluene;

TCA: acide trichloracétique;

Ara: rabinose;

AG-I: arabinogalactanes de type I ;

AG-II: arabinogalactanes de type II;

Araf : arabinofuranose;

DM: degré de méthylation;

DP: degré de polymérisation ;

DRX: diffraction des rayons X;

Fuc: fucose;

G: taux de gonflement;

Gal: galactose;

GalA: acide galacturonique;

HM: hautement méthylée;

IR: infrarouge ;

LM: faiblement méthylée;

pH: potentiel d'hydrogène;

RG I: ramnogalagturane de type I;

RG II: ramnogalagturane de type II;

Rha : rhamnose;

UV-VIS: ultraviolet visible;

Les polymères naturels sont des matériaux synthétisés par les êtres vivants comme les végétaux, les animaux et les micro-organismes. On trouve par exemple les polysaccharides (amidon, cellulose, agar, alginate, pectine, gomme, lignine, chitine et chitosane), les protéines (gélatine, protéines de soja, caséine, gluten, blé, soie et laine), ou encore les lipides (de source végétale ou animale).

Les polysaccharides sont une forme de glucides appelés aussi sucres, glucanes ou polyosides ; ils sont formés par la condensation d'unités glucidiques (**Berand, 2001**).

I.1. La pectine:

La pectine est un groupement complexe de polysaccharides existant en grande quantité dans le milieu lamellaire des cellules végétales (**Aspinal, 1970**). La pectine est commercialement obtenue à partir de la pelure de citron ou de pomme.

En industrie alimentaire, la pectine est souvent utilisée comme agent gélifiant et stabilisant dans les confitures, les marmelades et les desserts (**Lundin, 1993**).

I.1.1. Description des pectines et leurs origines:

C'est en 1825 que le chimiste français Bracconot donne le nom de «pectine» (du grec pektos signifiant «prise en gelée» en grec) aux substances extraites de fruits et qui gélifient en milieu sucré et acide. Depuis le début du XXème siècle, la pectine ou les pectines sont produites industriellement et sont utilisées comme agent gélifiant des denrées alimentaires (n° de code européen: **E440**).

Les pectines sont des polyosides complexes entrant dans la composition des parois cellulaires de la plupart des végétaux supérieurs. Elles sont majoritairement présentes dans la lamelle moyenne et la paroi primaire. Elles participent à la cohésion de la cellule et au maintien des parois par le biais d'interactions mécaniques et chimiques avec les autres constituants de la paroi. La quantité de substances pectiques dans le végétal varie fortement en fonction de son origine botanique et de son histoire (mode de culture, période de croissance...). Bien que les pectines puissent être extraites d'un grand nombre de végétaux (**Tableau I.1**), les sources industrielles principales sont le marc de pomme et les écorces d'agrumes (citron et orange) (**Voragen et al., 1995**).

D'un point de vue nutritionnel, les pectines sont considérées comme des fibres solubles ayant une forte capacité de rétention d'eau (**Donato, 2004**).

Tableau I.1. Principales sources de pectines d'intérêt industriel d'après **Thakur et al., (Thakur et al.,1997).**

Fruit	Teneur en substances pectiques
Zeste d'orange	3,5-5,5
Pulpe de citron	2,5-4,0
Pomme	0,5-1,6
Banane	0,7-1,2
Pêche	0,1-0,9
Fraise	0,6-0,7
Tomate	0,2-0,6
Carotte	0,2-0,5
fruit de passion	0,5
Mangue	0,26-0,42
Ananas	0,04-0,13

I.1.2. Extraction:

L'extraction industrielle de la pectine se fait à partir des sous-produits de l'industrie des jus de fruits. Les marcs de pommes et les écorces d'agrumes sont les sources principales et abondantes de pectine en raison de leur richesse en protopectine et en acide pectique (**May, 1990**).

a) Extraction de pectine de pomme:

La pectine de pomme est plus riche en sucres neutres et en amidon (qui constitue le «ballast») mais moins riche en protéines et calcium que la pectine d'agrumes (**May, 1990**).

Le procédé d'extraction est basé sur l'hydrolyse en milieu acide à chaud de la protopectine qui se transforme en acide pectinique. Le jus obtenu est traité par l'isopropanol, afin de précipiter la pectine. Le coagulum, à l'aspect fibreux, est lavé, pressé, séché sous vide, puis broyé pour obtenir une poudre fine (**Kirk, 1967**). Les réglages de la température, du pH et du temps de l'hydrolyse permettent de prédéterminer le DM de la pectine. Les pectines ainsi

extraites, ont le plus souvent un degré de méthylation compris entre 55 et 75 % (pectines HM). Leur masse moléculaire est généralement élevée. Les pectines LM sont obtenues par désestérification chimique, acide et/ou alcaline des pectines HM (May, 1990). Les différentes étapes de la fabrication des pectines sont représentées dans la **Figure I.1**.

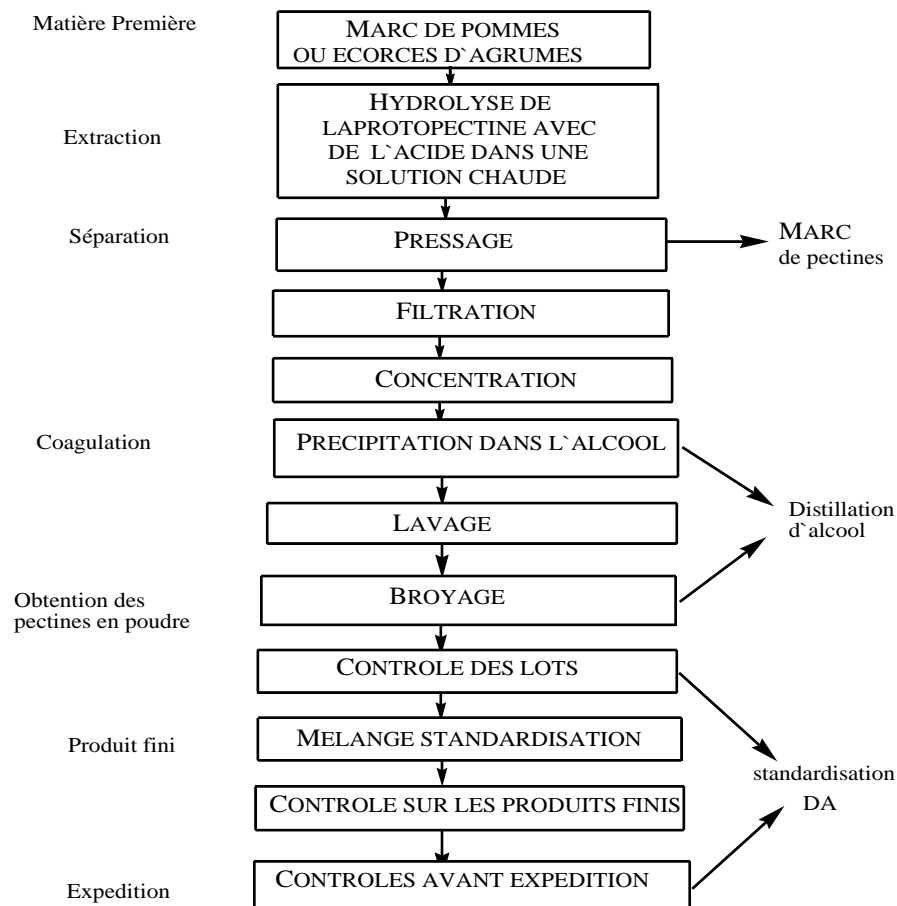


Figure I.1. Schéma d'extraction de la pectine (May , 1990).

b) Extraction de pectine de citron et/ou d'orange:

Le procédé d'extraction de la pectine est donné comme suit selon la description de **Sarath et al.** ; (Sarath et al., 2011); Srivastava et al.; (Srivastava et al., 2010); Tang et al. (Tang et al., 2011):

Peler les fruits de citron ou d'orange, laisse sécher, mélanger 50g de cette poudre dans 300ml d'eau distillée. L'eau utilisée a été auparavant acidifiée par 40% d'acide citrique et le pH a été maintenu à une valeur comprise entre 1,2 et 2 (**Tableau I.2**). Le mélange de poudre acidifié est ensuite chauffé à une température de 60°C durant 120minutes. Le mélange passe ensuite deux fois à travers une mousseline, puis est refroidi à la température ambiante. L'alcool éthylique est utilisé comme agent de précipitation pour isoler la pectine. Des extraits

de concentré de pectine sont précipités à l'aide de l'éthanol à 95%. Pour chaque volume d'éthanol ajouté, un volume d'extraits de pectine est retiré. Les extraits de fruits et d'éthanol utilisés dans des rapports 1:0,5; 1:1; 1:1,5 sont agités pendant 15 minutes. Le mélange repose ensuite durant 2h. La pectine est filtrée par la suite au travers d'un tissu formé de 4 couches de mousseline. Le précipité est lavé 2 à 3 fois par l'alcool éthylique pour éliminer toute impureté résiduelle supplémentaire puis, il est séché à une température comprise entre 35 et 40°C dans une étuve. Le résultat final donne un rendement de 18,21%. Le précipité est alors stocké dans des dessiccateurs pour un autre emploi.

Tableau I.2. Composition de formulation des pectines (Nilesh et al., 2012).

Code de Formulation	Ph	Ratio fruits/éthanol	Rendement Pratique	% Rendement
A	1,2	1:0,5	2,645	5,29
B	1,2	1:1	4,93	9,86
C	1,2	1:1	4,535	9,07
D	2	1:0,5	3,67	7,34
E	2	1:1	9,105	18,21
F	2	1:1	8,815	17,63

c) Extraction de pectine de betterave :

L'extraction des pectines à partir des pulpes de la betterave sucrière a été réalisée par plusieurs méthodes. Les plus importantes sont celles du traitement en milieu alcalin, de l'utilisation des autoclaves ou de l'hydrolyse enzymatique. Il s'avère que le meilleur rendement d'extraction est obtenu par le traitement alcalin (Daycott, 2006).

I.1.3. Propriétés physico-chimiques :

a) Masse moléculaire:

La détermination de la masse moléculaire des pectines est une donnée difficile à mesurer, cela est due à trois principales raisons:

- Les pectines sont par définition des molécules hétérogènes ;
- Une fois extraites et purifiées, elles deviennent parfois insolubles dans l'eau qui est pourtant le solvant qui a servi à leur extraction ;

- Molécules polyanioniques par définition, les pectines forment - à la suite d'interactions électrostatiques - des agrégats multimoléculaires (**Ralet *et al.*, 2002**).

b) Solubilité et précipitation:

Les pectines sont des hydrocolloïdes c'est-à-dire des polysaccharides qui, par définition, sont solubles ou solubilisables dans et par l'eau. Cette propriété est à la base même de leur valorisation dans le secteur agro-alimentaire. Toutefois, lors de la solubilisation d'un polymère, il y a compétition entre les interactions macromolécule / solvant et les interactions macromolécule / macromolécule. La solubilité des pectines sera donc conditionnée par un certain nombre de facteurs liés essentiellement à leurs structures et notamment : leur masse moléculaire, l'importance de leur taux de ramification, la valeur de leur degré de méthylestérification ainsi que la répartition des groupements méthylester le long de la chaîne pectique. Ainsi, il est admis qu'une pectine sera d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible, que sa structure est fortement ramifiée et que ces fonctions carboxyliques sont engagées dans une estérification avec le méthanol (taux de méthylestérification fort). Le pKa intrinsèque des GalA est de l'ordre de 3. Ainsi, lorsque le pH des solutions est supérieur à 3, les pectines sont sous leur forme ionique (**Thakur *et al.*, 1997**).

c) Propriétés gélifiantes et stabilisantes:

Les substances pectiques peuvent former des gels sous certaines conditions, ces propriétés sont très largement utilisées en industrie agroalimentaire où les pectines sont utilisées comme épaississant des solutions et stabilisant des émulsions. La formation d'un gel nécessite la constitution d'un réseau tri-dimensionnel retenant entre ses mailles la phase liquide, les macromolécules doivent donc fortement s'associer entre elles. Dans le cas des substances pectiques, les groupes hydroxyles et les fonctions acides peuvent permettre l'établissement de liaisons hydrogènes ou de liaisons de type ioniques. Les substances pectiques hautement et faiblement méthylées donnent des gels dans des conditions différentes (**Thibault, 1980**).

d) Propriétés viscosifiantes:

Cette propriété est obtenue quand les molécules modifient le comportement de la phase continue du fait de leur structure (PM/encombrement/...) sans pouvoir créer de zones de jonctions. Les pectines HM de haut poids moléculaire dans les milieux non propices à la gélification (ex : boisson fruitée) présentent cette propriété.

En ce qui concerne les pectines LM, on parlera plutôt de comportement typiquement viscoélastique, dont chacune des composantes peut être modifiée en fonction, par exemple, de la teneur en calcium du milieu réactionnel (Rees, 1970).

I.1.4. Structure:

Les pectines sont des hétéro-polysaccharides caractérisés par une forte teneur en acide galacturonique (GalA), monomères liés entre eux par des liaisons α -(1-4) et partiellement acétylés ou estérifiés par des groupements méthyles. Elles sont composées de différents polysaccharides qui associent les homogalacturonanes, les xylogalacturonanes, les rhamnogalacturonanes, les arabinanes, les galactanes et les arabinogalactanes. Cette association permet de décrire les pectines comme étant constituées essentiellement de trois domaines distincts, à savoir l'homogalacturonane et les rhamnogalacturonanes I et II (RG-I et RG-II) (Perrone *et al.*, 2002).

➤ Xylogalacturonanes:

Des galacturonanes riches en xylose ont été isolés du pollen de pin des graines de soja et du marc de pommes (Oechslein, 2002). La chaîne principale est homogalacturonane tandis que la chaîne latérale est constituée d'une seule unité xylose qui lie en position O-3 des résidus acide galacturonique (figure I.2).

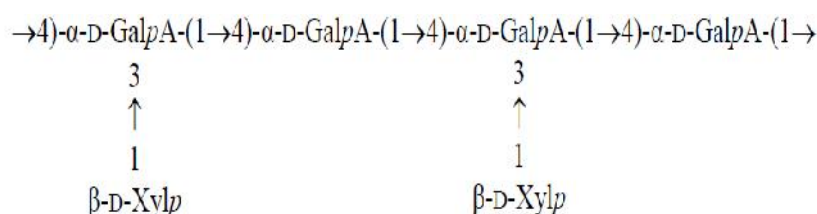


Figure I.2. Modèle structural du squelette Xylogalacturonane (Renard, 2010).

➤ Arabinanes:

Les Arabinanes constituant les chaînes latérales les plus répandues des pectines. Elles présentent une composition glucidique homogène et moins complexe (figure I.3). En effet, elles sont constituées uniquement d'unités α -L-arabinofuranose, liées entre elles par des liaisons α -(1-5), et qui peuvent être substituées en position O-3 ou O-2 par un autre α -L-arabinofuranose (Stephen, 1983).

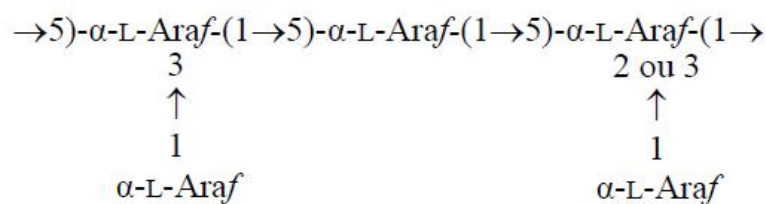


Figure I.3. Séquence primaire des arabinanes (Flanzy, 1998)

➤ **Galactanes:**

Les galactanes ne contenant que des résidus galactopyranose sont de loin les plus rares dans le monde végétal ou difficilement extractibles sans dégradation (**figure I.4**). Il s'agit d'un homopolymère formé d'unités galactopyranose liées $-(1 \rightarrow 4)$. Ce squelette peut porter un seul résidu galactose en position O-6 (**Arifkhodzhaev, 2002**).

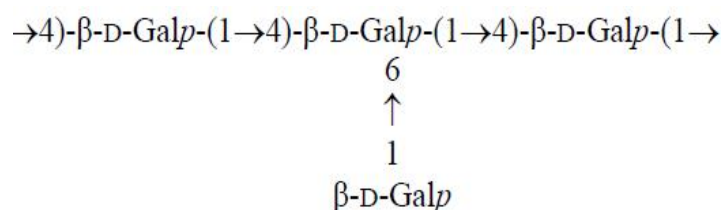


Figure I.4. Séquence primaire des galactanes (Flanzy, 1998).

➤ **Arabinogalactanes:**

Si les galactanes pures sont peu répandues dans la nature, les parois végétales contiennent des galactanes plus au moins ramifiées par des résidus arabinose appelées arabinogalactanes.

D'une part, les arabinogalactanes de type I (**Figure 1.5**), naturellement associées au squelette pectique, notamment aux rhamnogalacturonanes. Elles sont constituées des chaînes linéaires d'unités D-galactopyranose liées $-(1 \rightarrow 4)$, sur lesquelles sont attachées en position O-3 des unités D-galactopyranose et des unités L-arabinofuranose liées $(1 \rightarrow 5)$ (**Arifkhodzhaev, 2002**).

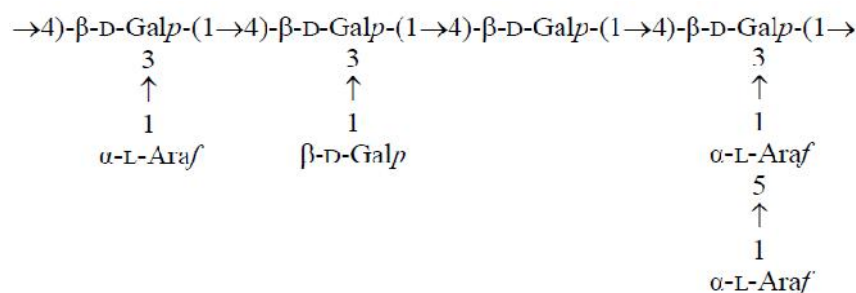


Figure I.5. Séquence primaire des arabinogalactanes de type I (AG-I) (Flanzy, 1998).

D'autre part, les arabinogalactanes de type II, les plus répandues dans la nature, sont constituées d'une chaîne principale $-(1 \rightarrow 3)-$ galactopyranose sur laquelle peuvent se greffer en position O-6 des chaînes latérales. Ces chaînes sont formées de courtes chaînes d'unités galactopyranose liées en $-(1 \rightarrow 6)$ et arabinofuranose liées en $-(1 \rightarrow 5)$. Ces chaînes latérales peuvent aussi être substituées soit par des résidus de galactose ou encore des unités arabinose d'où leur complexité structurale (**Figure I.6**).

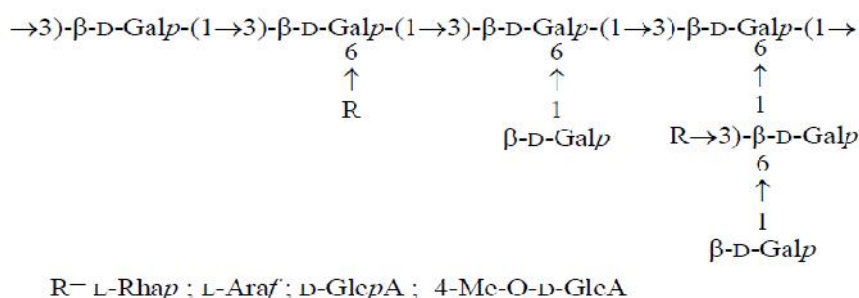


Figure I.6. Séquence primaire des arabinogalactanes de type II (AG-II) (**Flanzy, 1998**).

➤ Homogalacturonane:

Les homogalacturonanes (**Figure I.7**) représentent 57 à 69 % de la pectine (**Jackson *et al.*, 2007**). Ce sont des polymères linéaires constitués uniquement d'acides D-galacturoniques reliés entre eux par des liaisons $-(1 \rightarrow 4)$ et dont les fonctions carboxyliques et alcools peuvent être estérifiées respectivement par du méthanol en position C6 et par l'acide acétique en position C2 ou C3. Elles forment la zone lisse des pectines. La méthylestérification des régions homogalacturonanes détermine dans une large mesure l'application industrielle des pectines et leur capacité d'interaction (**Ralet *et al.*, 2005**). En effet, de nombreuses propriétés et fonctions biologiques des pectines sont déterminées par une interaction ionique entre régions homogalacturonanes (**Ridley *et al.*, 2001**).

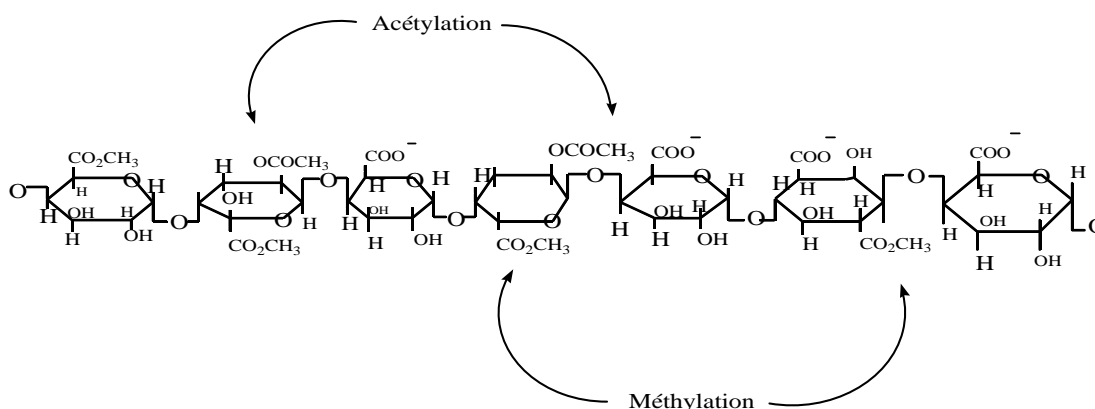


Figure I.7. Structure primaire d'un homogalacturonane.

➤ Rhamnogalacturonane type I:

Le RG-I est une famille de polysaccharides pectiques qui représente 7 à 14% de la pectine et environ 20 à 80% des rhamnoses du RG-I sont substitués (**Ridley *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2007**). Le RG-I d'un degré de polymérisation (DP) d'environ 1000 est constitué d'une alternance d'unités rhamnosiques et d'unités galacturoniques [4)- -D-GalA-(1 2) -L-Rha-(1].

Comme dans l'homogalacturonane, certains résidus d'acide galacturonique de RG-I sont acétylés (**Dumville *et al.*, 2000; Perrone *et al.*, 2002**).

Différents substituants polysaccharidiques neutres sont capables de se greffer à ce squelette osidique au niveau du carbone C4 du L-rhamnose (**Figure I.8**) (**Dumville *et al.*, 2000**).

Parmi ces substituants, on peut citer le L-arabinose, le D-galactose, les arabinanes, les galactane ou les arabinogalactanes (**Bonnin *et al.*, 2002a**). Chez certains végétaux (betterave, épinard, etc.), les chaînes latérales peuvent être substituées par des acides phénoliques (acide férulique ou coumarique) estérifiant les fonctions alcools en position 6 des résidus de galactose ou en position 2 des résidus d'arabinose (**Bonnin *et al.*, 2002b**).

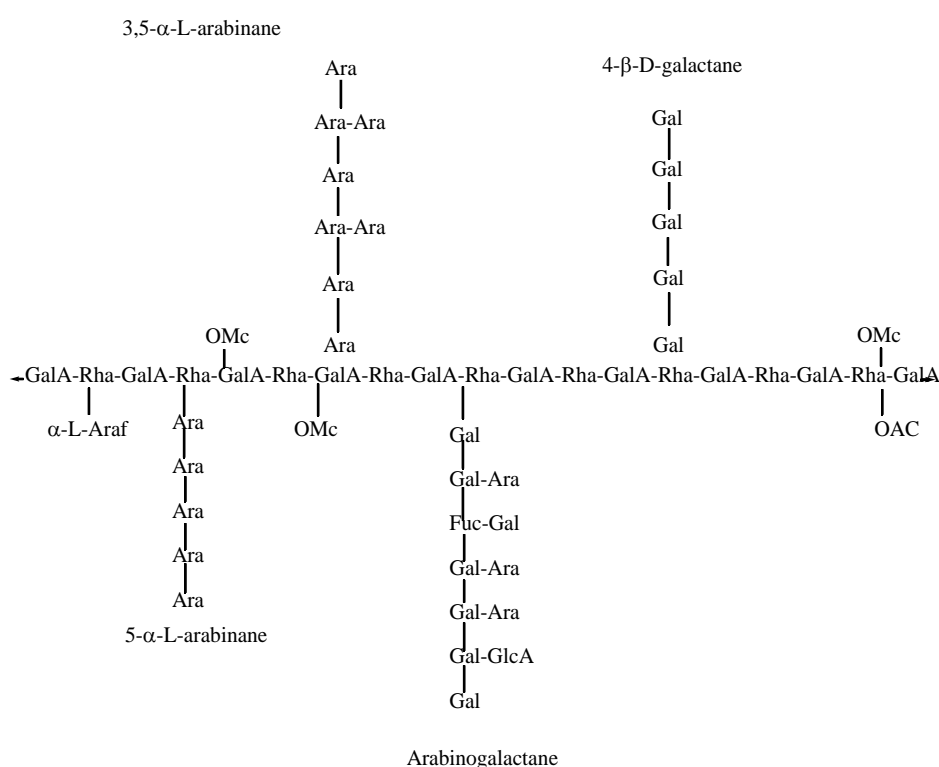


Figure I.8. Structure d'un rhamnogalacturonane I (**Dumville *et al.*, 2000**).

GalA : acide galacturonique; Rha : rhamnose ; Ar : arabinose; Araf : arabinofuranose; Gal : galactose; Fuc : fucose; GlcA : acide glucuronique; OMe : méthylation; OAc : acétylation.

➤ Rhamnogalacturonane type II:

Le RG-II est un galacturonane substitué qui représente 10 à 11% de la pectine et dont la structure complexe est très conservée au sein des espèces végétales (**Jackson *et al.*, 2007**). Avec un DP d'environ 60 (**Dumville *et al.*, 2000**), le RG-II comprend au moins huit résidus d'acides galacturoniques liés en 1-4 constituant la chaîne principale, sur laquelle sont greffés quatre complexes glycosidiques différents (**Figure I.9**). Ces complexes glycosidiques sont composés d'arabinofuranose, d'arabinopyranose, de glucopyranose, de fucopyranose, d'apiofuranose et de galactopyranose et d'autres sucres inhabituels tels que le Dha : acide 3-déoxy-D-lyxo-heptulosarique, le Kdo : acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique et l'acide acérique. Il contient également des sucres méthylés rarement observés comme le 2-O-méthylxylose et le 2-O-méthylfucose (**Ridley *et al.*, 2001**). Le RG-II se présente principalement sous la forme d'un dimère dans la paroi cellulaire des plantes par l'établissement de liaison covalente de diester de bore. Cette liaison est formée entre le OH-2 et le OH-3 des résidus β-Dapiofuranose de chaque sous-unité monomérique de RG-II. En outre, il a été montré que seul le résidu apio furanose de chaque chaîne latérale participe à cette dimérisation (**Ishi *et al.*, 1999 ; Ridley *et al.*, 2001**).

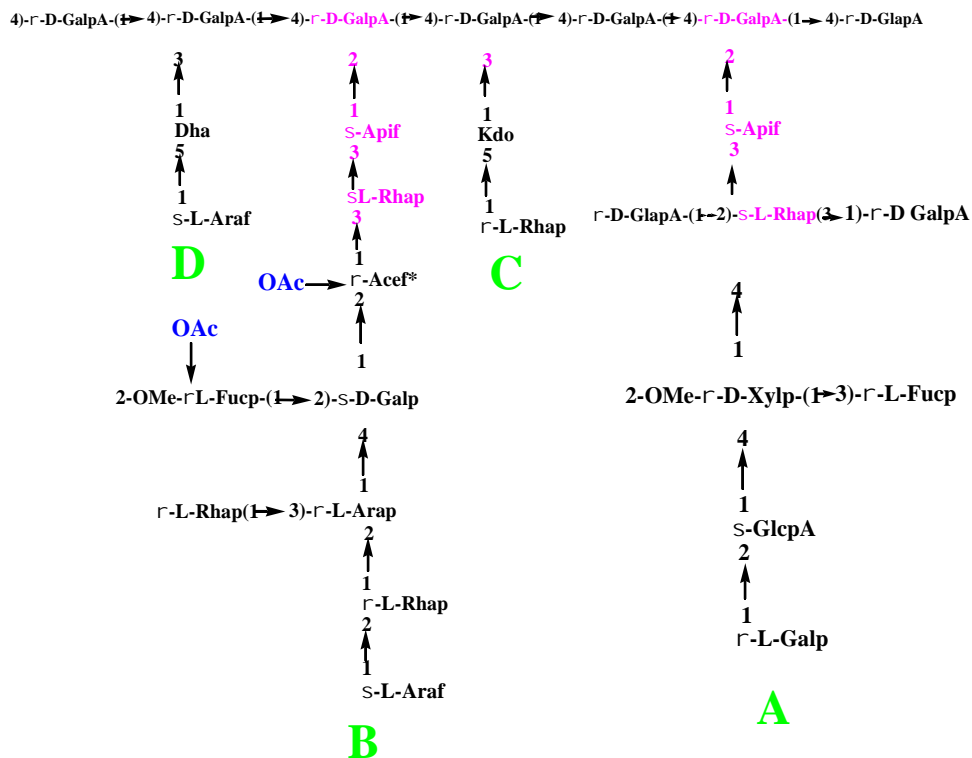


Figure I.9. Structure primaire du rhamnogalacturonane II avec quatre chaînes latérales de structure différente (A-D) (**Ridley *et al.*, 2001**).

Avec:

GalpA: acide galactopyranuronique; GlcpA: acide glucopyranuronique; Rhap : rhamnopyranose ; Arap: arabinopyranose; Galp : galactopyranose; Fucp : fucopyranose; Xylp : xylopyranose; Araf : arabinofuranose ; Apif : apiofuranose; AcefA: acide acérique; Dhap : acide 3-déoxy-D-lyxo-2-heptulopyranosylarique; Kdop: acide 3-déoxy-D-manno-2-octulopyranosylonique; OAc: O-acétylation; 2-O-MeFucp : 2-O-méthylation fucopyranose; 2-O-MeXylp: 2-O-méthylation xylopyranose.

I.1.5. Réactions d'oxydation:

➤ Par le periodate de potassium:

L'étude de l'oxydation de la pectine par le periodate de potassium a été faite en milieu aqueux à une température égale 35°C en fonction du temps et de la concentration de l'agent oxydant.

L'oxydation de la pectine par le periodate de potassium, conduit à la coupure des liaisons carbone-carbone, dans le cas où il y a des groupements hydroxyles vicinaux, pour former des aldéhydes (**Krausz *et al.*, 2008**).

Le mécanisme généralement proposé par **Munarin *et al*** (**Munarin *et al.*, 2012**) fait intervenir la dissociation du periodate. Puis, l'anion IO_4^- forme un intermédiaire cyclique qui conduit aux aldéhydes (**Figure I.10**).

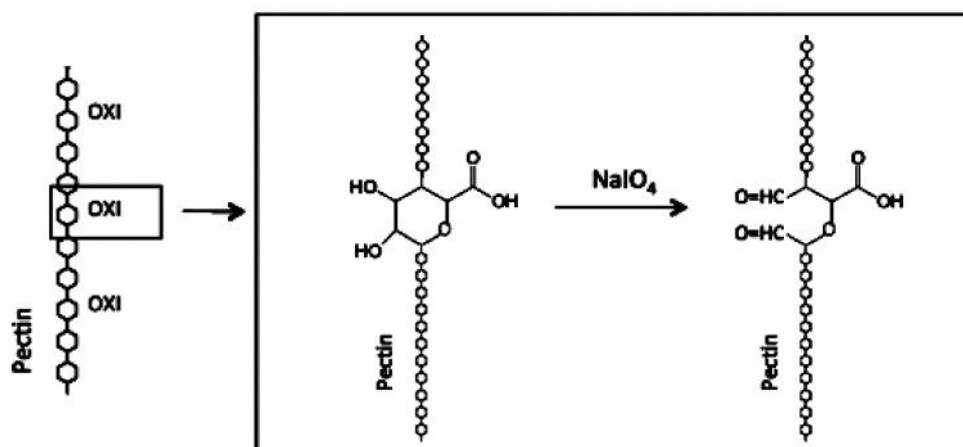
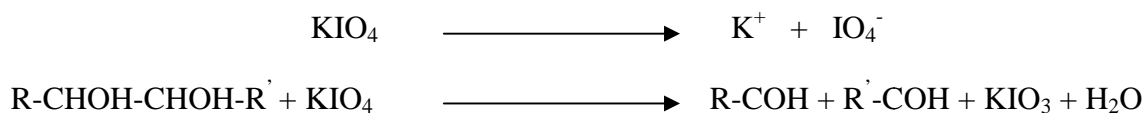
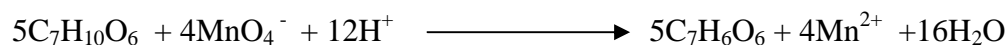


Figure I.10. Représentation schématique de l'oxydation de la pectine par le periodate (**Munarin *et al.*, 2012**).

➤ **Par le permanganate:**

La cinétique d'oxydation de la pectine naturelle par l'ion permanganate dans l'acide perchlorique a été étudiée par **abdelhamida *et al.*, (abdelhamida *et al.*, 2003).**



Le $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_6$ est l'unité répétitive de la pectine alors que le $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6$ est le dicétopectate formé après oxydation par le permanganate.

Le détail du déroulement au niveau moléculaire est représenté dans la **Figure I.11 (Khairou, 2003).**

I.1.6. Applications:

I.1.6.1. Pectine dans la nutrition et l'industrie alimentaire:

Comme il a été déjà cité plus haut, les pectines forment un gel dans certaines conditions. Cette propriété leur donne un grand intérêt dans l'industrie alimentaire. Elles sont utilisées aussi comme ingrédient dans la préparation des confitures, des marmelades et des gelées.

Des études récentes ont montré qu'elles peuvent être utilisées comme stabilisateur d'émulsion et également comme stabilisateur pour les acides des produits laitiers (**Voragen *et al.*, 1995).**

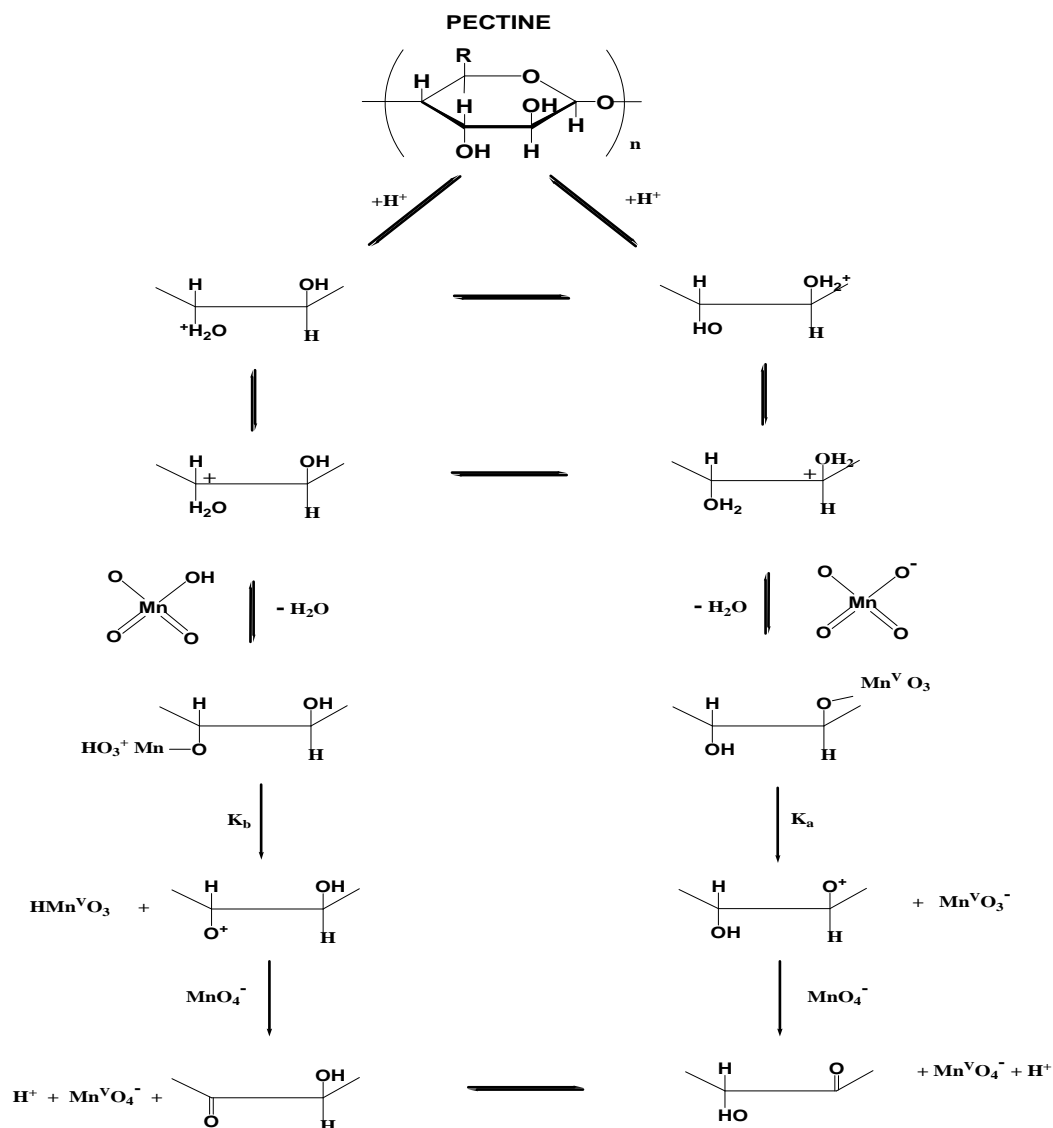


Figure I.11. Oxydation de la pectine par l'ion permanganate (Khairou, 2003).

I.1.6.2. Pectine dans la médecine et l'industrie pharmaceutique:

Jusqu'en 2002, la pectine était l'un des ingrédients principaux utilisés dans le Kaopectate, avec la kaolinite. Elle est également utilisée dans des pastilles pour le mal de gorge comme adoucissant. Dans les produits cosmétiques, elle agit en tant que stabilisateur et est employée dans les préparations curatives de blessures et plus particulièrement dans les adhésifs médicaux, tels que les dispositifs de colostomie (Naggar *et al.*, 1992).

Comme prophylactique naturel, la pectine agit contre l'empoisonnement des cations toxiques. Elle s'est montrée efficace dans l'élimination du plomb et du mercure dans l'appareil gastro-intestinal et les organes respiratoires. Lorsqu'elle est injectée par voie

intraveineuse, elle réduit le temps de coagulation du sang prélevé. De ce fait, elle est utile dans le contrôle de l'hémorragie ou de saignement local. Les combinaisons de celle-ci avec d'autres colloïdes ont été largement utilisées pour traiter la diarrhée, notamment chez les enfants en bas âge. Cependant, elle a une action antimicrobienne *in vitro* à l'égard de quelques souches bactériennes (**Thakur et al., 1997**).

Dans le traitement de la suralimentation, la pectine diminue le taux de digestion par les composants d'immobilisation alimentaires dans l'intestin. L'épaisseur d'une couche de pectine influe sur l'absorption en interdisant le contact de l'enzyme intestinale avec l'aliment en réduisant ainsi la disponibilité de ce dernier.

Dans les formulations à libération contrôlée, les hydrogels de pectine ont aussi été utilisés dans les comprimés comme liant.

La pectine s'est révélée d'une action prometteuse dans les colites ulcéreuses, la maladie de crohn et du cancer du colon (**Pranati et al., 2011**).

I.2. La chitine et le chitosane:

Le chitosane est obtenu après déacétylation de la chitine. Celle-ci est un copolymère des **2-acetamido-2-deoxy-P-D-glucose** et **2-amino-2-deoxy-B-D-glucose**. Elle diffère des autres polysaccharides par la présence d'azote en plus du carbone, hydrogène et oxygène dans la chaîne macromoléculaire (**Muzzarelli, 1985**).

La chitine est obtenue à partir de carapaces de crabes, crevettes, langoustines et homards. Son isolation passe par deux étapes: la déminéralisation par l'acide chlorhydrique et la déprotéinisation par la soude en solution. Les lipides et les pigments peuvent aussi être extraits. Ces opérations sont souvent empiriques et varient avec le degré de minéralisation des carapaces, les saisons et les conditions de température (**Muzzarelli, 1998**).

I.2.1. La chitine:

La chitine est un polymère constitué d'unités N-acétylglucosamine reliées entre elles par des liens (1-4) et peut donc être considérée comme l'équivalent aminé de la cellulose.

La source principale de la chitine est la carapace des crustacés (**Figure I.12**) qui subit pour ce faire une déprotéinisation suivie d'une déminéralisation.

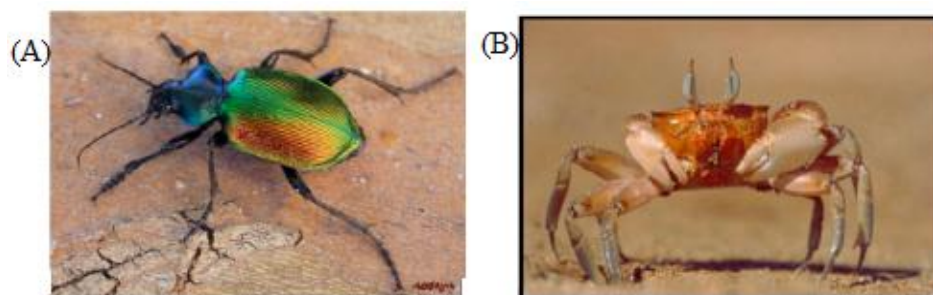


Figure I.12. La chitine est le constituant principal de l'exosquelette des insectes (A) et des crustacés (B).

I.2.2. Structure chimique:

La chitine possède une structure chimique similaire à celle de la cellulose. La différence réside dans la substitution du groupement hydroxyle en position C2 par un groupement acétamide (NHCOCH_3).

La structure chimique de la chitine est un enchaînement de monomères N-acétyl- β -D-glucosamine reliés par une liaison glycosidique (1 \rightarrow 4) (**figure I.13**) et la nomenclature définit cette structure comme celle d'un poly [β -(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-2-déoxy-D-glucopyranose] (**Chellat, 1999**).

Les chitines rencontrées dans le milieu naturel peuvent différer par la masse molaire, le taux d'acétylation et l'état plus ou moins cristallin. A l'état solide, les chaînes de chitine se présentent sous forme d'hélice avec une unité de répétition d'environ 1,03 nm. Comme dans le cas de la cellulose, chaque unité est constituée de deux résidus (**Creuzet *et al.*, 2006**).

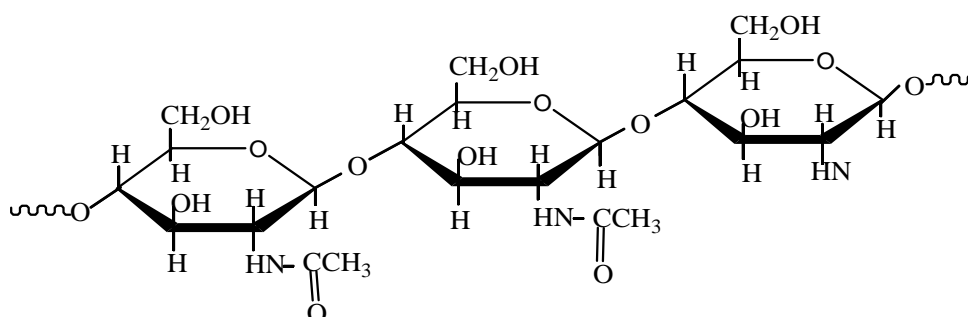


Figure I.13. Structure chimique de la chitine (**Chellat, 1999**).

En conséquence des divers arrangements des chaînes, trois formes distinctes de chitine ont été mises en évidence:

- la chitine : c'est la plus stable et la plus abondante des trois formes. Elle existe principalement dans les exosquelettes des arthropodes (crevettes, crabes par exemple). Ses

chaînes macromoléculaires s'arrangent de manière antiparallèle et cristallisent en absence d'eau dans un système orthorhombique contenant deux molécules.

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

- la chitine : elle a été identifiée dans la cuticule d'un brachiopode inarticulé. Elle est très peu caractérisée et plusieurs théories sont proposées à son égard. Toutefois, il semblerait que sa structure soit constituée de deux chaînes parallèles pour une chaîne antiparallèle (Desbrières *et al.*, 1997).

Bien que les sources potentielles de chitine soient très nombreuses, elle est essentiellement produite aujourd'hui à partir des carapaces de crevette (**Tableau I.3**) (Shahidi *et al.*, 2005).

La proportion de la chitine dans les déchets des crustacés justifie leur utilisation comme matière première pour obtenir la chitine. Cette valorisation des déchets permet une sauvegarde de l'environnement des régions industrielles où les crustacés constituent l'approvisionnement principal de diverses conserveries.

I.2.3. Degré de désacétylation:

Le degré de désacétylation se rapporte au déplacement du groupe d'acétyle de la chaîne que ceci est déterminé par titration potentiométrique. La solution homogène de Chitosane est préparée, diluée et employée l'HCl de concentration 0,010 mole/L est titrée par le NaOH de 0.1M. Le point final est détecté par les inflexions des valeurs de pH.

Deux inflexions ont été principalement notées : une première correspond à la neutralisation de HCl et une seconde à la neutralisation des ions d'ammonium dans la chaîne de chitosane. La différence entre les deux points d'inflexion donnent le degré de désacétylation qui se traduit par la quantité des groupements amine dans la chaîne de chitosane (Zhang *et al.*, 2011).

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

I.3. Le chitosane:

Le chitosane est un polysaccharide formé des copolymères de glucosamine et N-acétylglucosamine. Il est préparé généralement à partir de la chitine qui se trouve dans de nombreuses sources naturelles.

I.3.1. Extraction (Lamarque *et al.*, 2005):

La séquence de chitine et de chitosane est obtenue par lavage et broyage d'exosquelettes. Pour cela des coquilles de crevettes sont broyées et placées dans des béchers de 1000 ml et trempées dans l'hydroxyde de sodium (2 à 4% p/v) à ébullition pendant une heure afin de dissoudre les protéines et les sucres isolant ainsi la chitine brute.

Les échantillons sont ensuite bouillis dans l'hydroxyde de sodium, les béchers contenant les échantillons de coquilles de crevettes sont alors retirés de la plaque chauffante et laissés refroidir pendant 30 minutes à température ambiante. Ils sont ensuite broyés en morceau de 0.5 à 5 mm par un attendrisseur de viande.

Tableau I.3. Sources potentielles de chitine (Baldwin *et al.*, 1995).

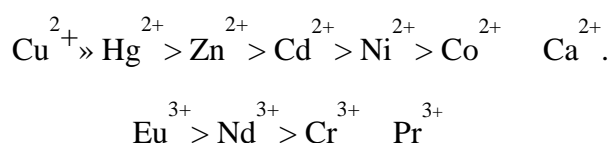
Sources de chitine	Teneur en chitine(%)
Bernacle (<i>Iepas anatifera</i>)	7
Crabre marbré (<i>Grapsus marmoratus</i>)	10
Crabe rouge (<i>Protus puber</i>)	10
Crabe araignée (<i>Maia saquinado</i>)	16
Homard (<i>Homaris vulgaris</i>)	17
Homard sauterelle (<i>Scyllarus arctus</i>)	25
Langouste (<i>Palinurus vulgaris</i>)	32
Ecrevisse (<i>Astacus fluviatilis</i>)	36
Crevettes (<i>Palaemon fabricius</i>)	22
Seiche (<i>Sepia officinalis</i>)	20
Calmar (<i>loligo vulgaris</i>)	40

I.3.2. Propriétés complexantes:

- **Complexes avec les ions métalliques:**

Le chitosane possède de bonnes propriétés chélatantes; les groupements amines –NH retrouvés sur les chaînes saccharidiques montrent de fortes interactions avec les ions métalliques. Un grand nombre de publications porte sur le potentiel lié aux interactions entre le chitosane et les métaux. La nature de l'ion métallique est importante car les mécanismes d'interactions varient.

Des études effectuées par **Rhazi et al., (Rhazi et al., 2002)** ont montré la différence d'affinité qui existe entre le chitosane (sous forme de films) et des cations divalents et trivalents:



Plusieurs facteurs affectent la formation de complexes avec le chitosane dont le pH et le degré de polymérisation (DP). La nature de l'ion et du contre-ion joue aussi un rôle important dans l'interaction entre les unités de glucosamine et le cation. La complexation dépend enfin de l'état physique du chitosane (film, fibre, gel, poudre ou solution) (**Rhazi et al., 2002, Peniche-Covas et al., 1992**).

D'après **Rhazi et al (Rhazi et al., 2002)**, le cuivre (II), cation montrant la plus grande affinité avec le chitosane, forme à pH>5 un complexe de type I et à pH<5.8, un complexe de type II (**Figure I.14**). Cette équipe a démontré, par des études potentiométriques et de dichroïsme circulaire (CD), la formation de complexes de type I lorsque le DP des COS est inférieur à 6 et de type II pour le chitosane (polymère). Les propriétés chélatantes du chitosane sont appliquées notamment pour le traitement des eaux usées ou encore pour le développement de phases stationnaires chromatographiques pour la séparation des protéines et des saccharides (**Carunchio et al., 1987; Jinno et Takayarna, 1989**).

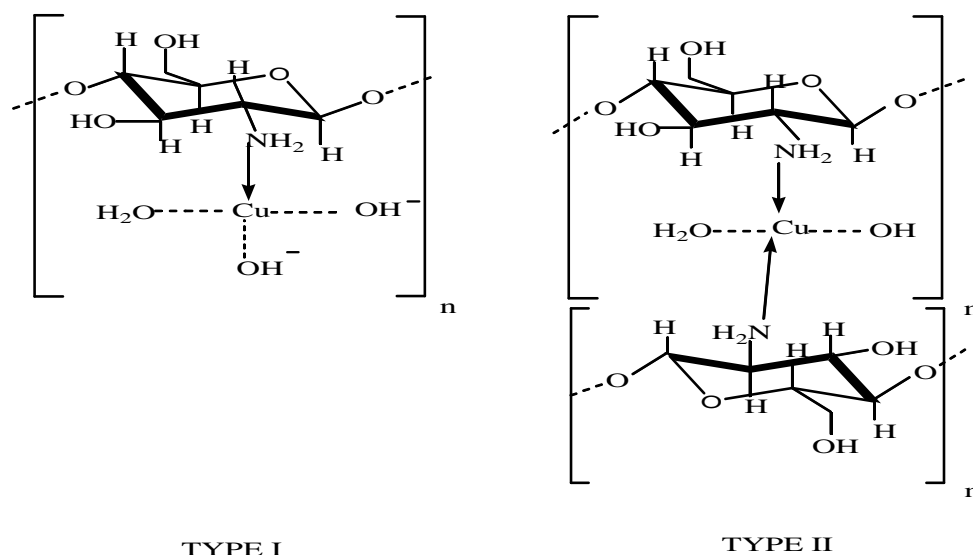


Figure 1.14. Structures proposées du complexe entre cuivre (II) et le chitosane

(Rhazi *et al.*, 2002)

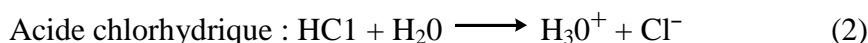
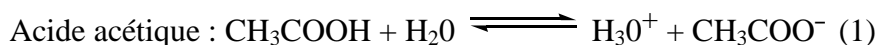
I.3.3. Caractérisation:

a) La solubilité:

Le chitosane est une grosse molécule (1000 à 2000 kDa, 5000 résidus) qui forme des solutions visqueuses (Kumar *et al.*, 2004b). Le chitosane commercial existe sous la forme d'une poudre insoluble dans l'eau. La solubilité du chitosane a lieu en milieu acide dilué par protonation des groupements aminés du chitosane sous la forme NH_3^+ . Les facteurs qui influencent la solubilité du chitosane sont le type et la concentration d'acide (Rinaudo *et al.*, 1999), la force ionique du milieu (Onsoyen et Skaugrud, 1990), et le degré d'acétylation du chitosane (Varum *et al.*, 1994).

Il est à noter que l'effet de l'acide utilisé influe fortement sur la solubilisation du chitosane qui peut se faire par ajout d'acide organique ou minéral. Le pH de la solution de chitosane est alors inférieur à 6,5 (Peniston *et al.*, 1980). Les acides les plus utilisés sont l'acide acétique et l'acide chlorhydrique à une concentration de 1% ou 0,1 M (Rinaudo *et al.*, 1999). Par contre, le chitosane est insoluble dans l'acide sulfurique ainsi que l'acide phosphorique.

Rinaudo *et al.*, (Rinaudo *et al.*, 1999) ont étudié la solubilisation du chitosane avec l'acide acétique ou l'acide chlorhydrique. L'acide acétique étant un acide faible, il est partiellement dissocié en solution, tandis que l'acide chlorhydrique est un acide fort, donc totalement dissocié (Rinaudo *et al.*, 1999). En milieu aqueux, les réactions de dissociation de ces deux acides s'écrivent de la manière suivante :



En milieu acide, le chitosane sous forme basique (Chit-NH₂) est une base faible qui va réagir avec les protons H₃O⁺ issus des acides pour donner la forme protonée du chitosane (Chit-NH₃⁺) selon la réaction d'équilibre suivante :



Que ce soit avec l'acide acétique ou l'acide chlorhydrique, le pH de la solution de chitosane était d'environ 5 (**Rinaudo *et al.*, 1999**). La solubilisation complète est obtenue quand le degré de protonation est d'environ 50 %. Le rapport stœchiométrique [Acide] / [Chit-NH₂] est alors de 0,5-0,6. Par ailleurs, une précipitation du chitosane se produit avec l'acide chlorhydrique par effet de « salting-out » lorsque la concentration en acide est supérieure à 1M, alors que le chitosane reste soluble dans l'acide acétique 16,5M. L'explication est que seule la fraction dissociée de l'acide joue un rôle dans la force ionique de la solution. Dans un excès d'acide acétique, le degré de dissociation reste assez faible, de même que la force ionique du milieu. En revanche, dans l'acide chlorhydrique, toutes les espèces ioniques sont dissociées, ce qui augmente considérablement la force ionique du milieu (**Rinaudo *et al.*, 1999**).

b) Complexes électrostatiques:

Le chitosane a la capacité de former des complexes électrostatiques dans des conditions acides. On reconnaît deux différents types de complexes électrostatiques:

La complexation avec des surfactants de charges opposées et la complexation avec des polyélectrolytes de charges opposées (PEC).

➤ Interactions avec les surfactants:

Le chitosane de faible DA forme avec le sodium dodécylsulfate (SDS) un système micellaire stable montrant une concentration d'agrégation critique (CAC) 100 fois plus petite que la concentration micellaire critique (CMC) du surfactant lui-même (**Desbrière *et al.*, 1997; Babak *et al.*, 1999**).

De plus, l'association entre une solution de chitosane et le SDS se caractérise par la formation de nanostructures ordonnées. Un système réticulé se crée entre une couche de gel

chitosane et les charges portées par le surfactant. Cette structure pourrait permettre la stabilisation de macromolécules telles que des enzymes (**Babak et Merkovich, 2001**).

➤ **Interactions avec divers polyélectrolytes :**

Plusieurs complexes sont répertoriés dans la littérature entre le chitosane et certains polymères d'origine naturelle ou synthétique. Les études se basent sur la relation qui existe entre la « stabilité » du système polymérique et la nature des groupements ioniques entrant en jeu. On retrouve divers complexes électrostatiques formés avec l'acide polyacrylique, le xanthane, certains carragénanes, l'alginate, la pectine, l'héparine, l'acide hyaluronique ou encore la chondroïtine (**Vasiliu et al., 2005, Goycoolea et al., 2000**). Selon les conditions expérimentales, la complexation avec l'alginate ou l'acide hyaluronique montre l'interaction entre les groupements carboxylates ($-\text{COO}^-$) et les fonctions amines protonées ($-\text{NH}_3^+$) du chitosane (**Arguelles-Monal et al., 2000**).

Lors de formulations thérapeutiques orales sous forme de billes ou des comprimés, le chitosane peut créer une couche protectrice hydratée à pH gastrique. Ceci permet la libération de substances thérapeutiques par contrôle de la dissolution de l'alginate à pH élevés (milieu intestinal), pH auxquels le chitosane devient insoluble. L'association peut se faire aussi à l'aide d'ions du type cationique, tel que le calcium (Ca^{2+}), permettant ainsi d'obtenir des complexes stables chitosane-alginate pH dépendants (**Huguet et al., 1994, Hari et al., 1996, Fwu-Long et al., 2002**). On retrouve un grand nombre de polyélectrolytes au niveau cellulaire notamment sur l'ADN. Plusieurs articles mentionnent les potentiels de complexation entre l'ADN et le chitosane, en particulier celui de faible masse moléculaire ou sous forme d'oligomères (**Koping-Hoggard et al., 2001; Strand et al., 2005**). Les études ont montré qu'un degré de polymérisation supérieur à six unités permet d'obtenir des complexes stables par interaction ionique avec les phosphates (chargés négativement) retrouvés dans la structure de l'ADN et les fonctions amines protonées des unités glucosamines, montrant selon les conditions expérimentales, de bonnes activités de transfection (**Koping-Hoggard et al., 2004**).

I.3.4. Dérivés du chitosane:

Le chitosane possède des propriétés chimiques et biologiques singulières attribuées à la présence des groupes amines et hydroxyles. Ces groupes permettent des modifications chimiques du chitosane qui incluent : l'acylation, l'alkylation, la formation de base de Schiff, l'alkylation réductrice, la carboxyméthylation et la carboxyalkylation (**Figure I.15**).

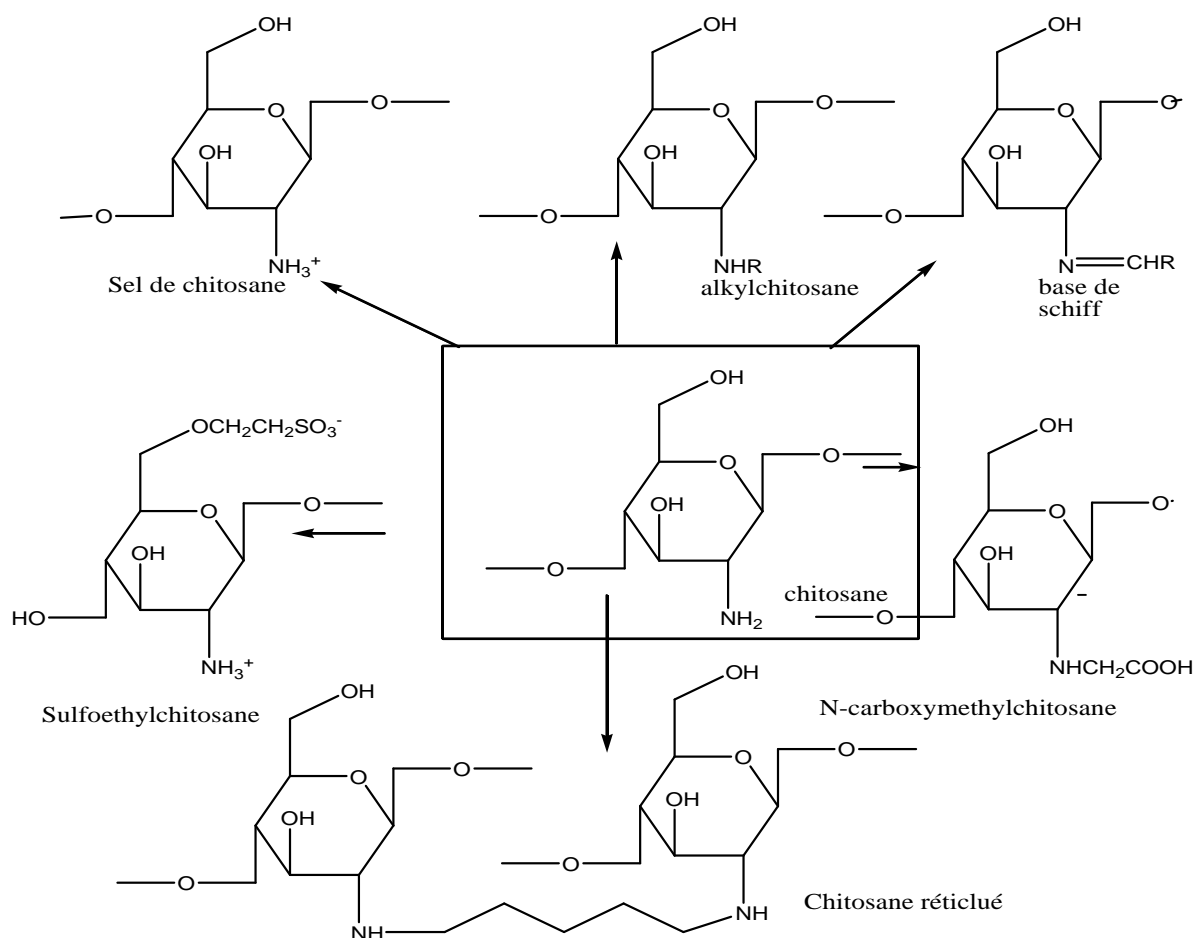


Figure I.15. Exemples de dérivés chimiques du chitosane (Crini, 2005).

I.3.5. Applications du chitosane et chitine:

Les applications du chitosane sont variées et les nouvelles études pour en développer ne cessent de se multiplier à cause de ses propriétés physico-chimiques et biologiques (Muzzarelli, 1988). Il est entre autres non fermentable, biocompatible, biodégradable et non toxique. De plus, son coût de fabrication est peu élevé.

A titre d'exemple, quelques propriétés utilisées dans les différents champs d'application du chitosane sont données dans le **tableau I.4** (Kumar, 2000).

Il est donc d'un grand intérêt en pharmacie, dans l'industrie agro-alimentaire, pour les cosmétiques à cause de ces propriétés viscoélastiques qui peuvent varier de manière très significative même pour des petites quantités de polymère. Il peut donc être utilisé comme modificateur de texture et stabilisante (Kumar, 2000).

Tableau I.4. Quelques propriétés et applications des gels de chitosane (**Kumar, 2000**).

Champ d'application	Applications	Propriétés
Pharmacie	Encapsulation de Médicaments.	Matériel absorbable à possibilité de contrôle de libération de principes actifs (enzyme, médicament).
Clinique	Membrane de dialyse ; Pansements ;	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 légumes ou de viande.	Formation de films, épaississant.
Traitement des eaux	Agent flocculant de cations.	Polyélectrolytes; chélation de métaux.

Dans de nombreuses applications, le chitosane est utilisé sous forme d'hydrogels et plus précisément d'hydrogels chargés, le chitosane étant un polyélectrolyte en milieu acide. Les gels de chitosane se sont avérés très intéressants pour immobiliser des médicaments (**Chandy, 1998**) ou des enzymes (**Airoidi, 2000**) et permettre une libération contrôlée de ces molécules selon le pH du milieu environnant. Des travaux menés par, **Ramanathan et al. (Ramanathan et al., 2001)** ont montré que le chitosane est aussi intéressant pour produire des matrices à libération contrôlée sous l'effet d'un champ électrique. Elles pourraient être utilisées pour des libérations transdermales de médicaments (**Ramanathan et al., 2001**).

La chitine a une basse toxicité et inerte dans l'étendue gastro-intestinale des mammifères. Elle est biodégradable. Cette biodégradabilité est due en principe à la présence de chitinases largement distribués dans la nature, dans les bactéries, les moisissures, les plantes, et les systèmes digestifs de plusieurs animaux. Les chitinases sont impliquées aussi dans la défense de l'hôte contre l'invasion bactérienne (**Rinaudo, 2006**).

La chitine a été utilisée pour préparer une colonne d'affinité chromatographique, pour isoler les lectines et déterminer leur structure. La chitine et la 6-O-carboxyméthyl-chitine activent des macrophages péritonéaux *in vivo*, suppriment l'augmentation des cellules de la tumeur chez les souris, et stimulent les hôtes non-spécifiques à la résistance contre l'infection d'*Escherichia coli*. La chitine accélère aussi la guérison des blessures. Elle est utilisée largement pour immobiliser des enzymes et cellules entières, dont l'immobilisation de l'enzyme a des applications dans l'industrie de la nourriture. C'est un excipient et un porteur de la drogue dans le film sous forme de gel ou poudre, pour les applications de la mucoadhesivité. Il existe une matrice sous forme de pate dure à base de l' hydroxy-apatite/chitine/chitosane qui est utilisée dans la génération tissulaire notamment dans le traitement des défauts osseux **(Rinaudo, 2006)**.

Les biopolymères occupent une place prépondérante dans les industries alimentaires (confiserie...), et pharmaceutiques (cosmétique, excipients...). Récemment, diverses études sont consacrées à leur usage hémostatique et cicatrisant (**Peroglio, 2008**).

Il existe dans la nature de nombreuses variétés de polysaccharides répertoriées, auxquelles l'intérêt porté est proportionnel à leurs propriétés et leurs applications potentielles. Ces polysaccharides peuvent être d'origine végétale, c'est le cas de l'amidon, de la cellulose, des pectines ou des gommes. Ils peuvent également être issus des algues comme les alginates, les carraghénanes, l'agar ou les fucanes, ou encore être d'origine animale (héparine, chondroïtine), ou microbienne (dextranes, xanthanes, chitine ou chitosane).

Les polysaccharides fortement utilisés dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique, pour leurs propriétés technologiques, physiologiques et pharmaceutiques, sont des acteurs importants dans l'économie mondiale.

Lors de la réalisation de ce mémoire de Master, nous nous sommes particulièrement intéressés à un polysaccharide qui est la pectine appelée aussi selon un grand nombre d'auteur molécule miracle à cause de sa composition aussi complexe. Elle renferme en plus du polygalactoronique et d'autres polysaccharides, l'acide ferulique, un des meilleurs agents antioxydant. Il est connu par son action cytotoxique, d'une part.

D'autre part, étant donné que la pectine est utilisée dans la composition de dispositifs médicaux pour la régénération tissulaire et dans la libération médicamenteuse. L'addition d'autres polymères pour donner naissance à de nouveaux matériaux ayant des propriétés particulières selon l'application recherchée s'impose.

Parmi les réactions les plus sollicitées, la réticulation par les acides, les aldéhydes, les époxydes et autres, se fait en présence d'agents dont les effets indésirables augmentent avec la décomposition et la dégradation du matériau. Pour surmonter ce type de problème, nous avons tenté d'oxyder la pectine par introduction de nouveaux groupements fonctionnels tels que les aldéhydes, les cétones et les acides carboxyliques qui sont tous potentiellement actifs en présence d'entités susceptibles de former de nouveaux réseaux polymérique.

Nous avons cependant orienté notre étude vers la conception des films constitués de polysaccharides tels que le chitosane, la pectine et la gélatine.

Les films de gélatine/chitosane réticulés par les pectines oxydées (par le periodate et l'hypochlorite de sodium) et par le glutaraldehyde ont été préparés dans un premier temps. Par

la suite, la compatibilité ou les interactions entre les deux polysaccharides et/ou polysaccharide/protéine ont été estimés par des dosages chimiques, degré de réticulation, détermination du nombre de moles des -amino groups, dosage des protéines par l'acide Bicinchoninique), par IR-TF et DRX. Des tests biologiques oxydante en utilisant le test de *DPPH*, l'étude du *pouvoir réducteur* et de l'activité antibactérienne et la biocompatibilité avec le sang ont été évalués.

Le manuscrit se compose de trois parties majeures:

- Le premier chapitre concernera une approche bibliographique sur les polysaccharides d'une manière générale et sur le chitosane et la pectine d'une façon plus élaborée. Quelques procédés d'extraction des pectines de différents types ont été abordés.
- Le deuxième chapitre constitue la partie expérimentale. On y trouve une description détaillée des méthodes et des matériels utilisés.
- Le troisième chapitre présente nos résultats obtenus suivis d'interprétations en s'appuyant sur un éventail de références bibliographiques. Il renferme trois parties :
 - Partie 1 : *Oxydation de la pectine;*
 - Partie 2 : *Effet de la gélatine sur les pectines oxydées;*
 - Partie 3 : *Effet du chitosane sur les pectines oxydées.*

II. Matériels et Méthodes:

II.1. Matériels:

1. Pectine de pomme $\text{pH}=1.5$; $\text{pK}_a=1,5-2$ (Aldrich, Sigma);
2. Eau de javel commerciale 12° ;
3. Periodate de sodium, $\text{MM}=213,89$ (Aldrich, Sigma)
4. Acide sulfurique (H_2SO_4) (12M);
5. Thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), $\text{MM}=158,1$;
6. Iodure de potassium (KI), $\text{MM}=166,0$;
7. Empois d'amidon;
8. Hydroxyde de sodium (NaOH), $\text{MM}= 40$;
9. Chlorhydrate d'hydroxylamine ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$);
10. Acide chlorhydrique (HCl), $\text{MM}= 36,5$;
11. Phénolphtaléine;
12. Chlorure de sodium (NaCl), $\text{MM}= 58,5$;
13. Gélatine en poudre de type A (peau de porc), bloom 300, $\text{pH}=5,6$, $\text{PI}=9$ (Sigma);
14. Chitosane; viscosity 800.000 cps (Aldrich, Sigma)
15. bromure de potassium (KBr), $\text{MM}=119,002$;
16. chlorure de potassium (KCl), $\text{MM}=74,551$;
17. Carbonate de sodium (NaHCO_3), $\text{MM}= 84$;
18. Dihydrogenophosphate de sodium appelé aussi phosphate monosodique ou phosphate de sodium monobasique (NaH_2PO_4), $\text{MM}=104$;
19. Hydrogenophosphate de sodium appelé aussi phosphate disodique (Na_2HPO_4), $\text{MM}=126$;
20. Phosphate de potassium (KH_2PO_4), $\text{MM}= 100$;
21. Gélose Muller–Hinton;
22. Glutaraldehyde (50%) (Aldrich);
23. DPPH : 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle
24. Acide bicinchoninique (BCA);
25. TNBS: acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (5% en masse dans l'eau) (Sigma)
26. Ether diéthylique ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$), $\text{MM}=74,1216$; (Aldrich, Sigma)
27. Acide lactique, $\text{MM}= 90.08$ (Aldrich, Sigma)
28. Acétate d'éthyle; (Sigma)
29. Disques d'amoxicilline;

30. Les disques gentamicine;
31. Les disques trimsulfa;
32. Sulfate de cuivre (CuSO_4) (Biochem)
33. Acide trichloroacétique (Fluka Chemika);
34. Ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) MM=329,244;
35. BHT : Butylated hydroxyanisole
36. Acide ascorbique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) MM= 176,1241;
37. chlorure de fer(III) (FeCl_3) MM= 162,204;
38. Sang humain rhésus O^+
39. Periodate de sodium (NaIO_4) (Sigma, Aldrich) MM= 213,89;
40. BSA (Bovine Sérum Albumine).
41. *Bacillus subtilis*, APCC 25927;
42. *Staphylococcus aureus*, APCC 25923;
43. *Escherichia coli*, APCC 25922;
44. *Pseudomonas aeruginosa*, APCC 27853;

II.2. Méthodes:

II.2.1. Titrage indirect de l'eau de javel:

L'eau de Javel est une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium et de chlorure de potassium ou de sodium. En milieu acide, les ions hypochlorite $\text{ClO}^-_{(\text{aq})}$ de l'eau de Javel mis en présence d'ions iodure $\text{I}^-_{(\text{aq})}$ **en excès** sont réduits en ions chlorure $\text{Cl}^-_{(\text{aq})}$ et il y a formation de diiode $\text{I}_{2(\text{aq})}$ (**appelée réaction 1**). (**Voir chapitre III**)

La quantité de matière de diiode formé est ensuite déterminée par un titrage au moyen d'une solution aqueuse de thiosulfate de sodium de concentration connue (**appelée réaction 2**). (**Voir chapitre III**)

On prend un bécher de 100 cm^3 , on y met 10 ml d'une solution diluée 100 fois de l'eau de javel (S), 20 ml d'acide sulfurique à 2 mol/l, 30 ml d'iodure de potassium à 0,10 mol/l puis on verse quelques gouttes d'empois d'amidon avec une agitation intense (la couleur obtenue est violette).

Par la suite, on met $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$ d'une solution de thiosulfate de sodium dans la burette, on verse jusqu'à la disparition totale de la couleur. Il résulte que $V = 11 \text{ ml}$.

➤ **Le degré chlorométrique** correspond au nombre de litres de chlore gazeux qu'un litre de solution ou d'extrait est capable de dégager en présence d'un acide dans des conditions

normales de température et de pression. Il est utilisé dans les préparations des solutions de l'hypochlorite de sodium (solution de Javel) et le Dakin.

II.2.1.1 Préparation de différents pourcentages en chlore actif;

Le (%) de Chlore actif : Est l'unité qui représente la masse de dichlore (Cl_2) libérée à partir de 100g d'eau de javel.

Tableau II.1. Degré chlorométrique, % Chlore actif et gramme de Cl actif par L

degré chlorométrique	% de Chlore actif	Gramme de Chlore actif par L
12	3,80	38,04
0,789	0,25	2,5
2,366	0,75	7,5
4,732	1,5	15
9,464	3	30

Selon la webographie, le degré chlorométrique égal à 12° est préparé par dilution de l'extrait de Javel (48°) au quart (1/4) (250 ml de NaOCl + 750 ml d'eau).

Pour préparer une solution d'hypochlorite de sodium avec un % de Cl actif égal à 0,25%, il nous suffit de préparer un NaOCl où le degré chlorométrique égal à 0,789 par dilution d'une solution de NaOCl de 12° (**Tableau II.1**); la dilution se fait comme suit:

% de Chlore actif=0,25%: 065,78ml NaOCl + 937,21ml H_2O

% de Chlore actif=0,75%: 197,23 ml NaOCl + 802,76ml H_2O

% de Chlore actif=1,50%: 395,25 ml NaOCl + 604,74ml H_2O

% de Chlore actif=3,00%: 793,65ml NaOCl + 206,34ml H_2O

II.2.2. Oxydation de la pectine par l'eau de javel (NaOCl):

35% de pectine sont préparés en ajoutant de l'eau désionisée à 17 g de pectine pour un poids final de 423 g dans un bécher de 100 mL. La suspension de pectine est maintenue à 35°C. L'agitation est faite manuellement à l'aide d'une baguette en verre. Le pH est ajusté à 9,5 avec NaOH (2N). 0,85g d'hypochlorite de sodium, (0,5 g de chlore active /17 g de pectine, soit 0,25% de chlore actif en poids / poids) sont ajoutés lentement dans la suspension de la pectine pendant 30 min tout en maintenant le pH à 9,5 en l'ajustant avec du H_2SO_4 (1N). Après l'addition de NaOCl, le pH de la suspension est toujours maintenu à 9,5 par NaOH (1N)

pendant 50 minutes supplémentaires. La suspension est ensuite neutralisée à un pH= 7,0 avec H_2SO_4 (1N), isolée par centrifugation, lavée avec un volume d'eau distillée et séchée à l'étuve à 40°C pendant 24 h. La même procédure a été reprise pour les différentes concentrations de chlore actif (0,75, 1,5 et 3,0% en poids / poids).

II.2.3. Oxydation de la pectine par le periodate de sodium (NaIO_4):

L'oxydation de la pectine par le periodate de sodium est notée en milieu aqueux à une température égale 35°C et à pH égal à 4. Pour ajuster ce dernier, l'acidification du milieu est faite à l'aide de l'acide sulfurique (0,1M), alors que l'alcalinisation dans du carbonate de sodium (0,1M). La solution de pectine est de 1%. Pour ce faire, nous avons mis: 3g de pectine dans 60 ml d'eau distillée. Le volume du periodate est fixé à 30ml, les temps choisis est 1h, 2h, 3h et 4h. Les concentrations de NaIO_4 sont: 0,028M, 0,056M, 0,084M et 0,112M.

La réaction est portée dans un ballon de 100 ml sous agitation magnétique à l'abri de la lumière dans du papier d'aluminium afin d'éviter l'auto oxydation.

Pour stopper la réaction, on prend chaque une heure 40 ml de la solution et on verse 20 ml d'éthanol. L'éthanol est un inhibiteur de la réaction d'oxydation. Il favorise aussi la gélification de la pectine. Un lavage à l'eau est effectué. Le composé formé est étalé dans des boîtes de pétries en polystyrène.

II.2.4. Dosages chimiques:

II.2.4.1. Détermination de la teneur en carbonyle (1ère méthode):

La teneur en carbonyle a été déterminée en suivant la méthode titrimétrique de **Smith, (Smith, 1967)**. Quatre grammes de pectine sont mis en suspension dans 100 ml d'eau distillée dans un bécher de 500 ml. La suspension a été gélifiée dans un bain d'eau bouillante pendant 20 min, refroidie à 40°C, ajustée à un pH=3,2 avec HCl (0,1 N) puis on lui a ajouté 15 ml du réactif d'hydroxylamine. Le ballon a été bouché et placé dans un bain d'eau à 40 °C pendant 4 h sous faible agitation. L'excès d'hydroxylamine a été déterminé par titrage rapide du mélange réactionnel à un pH de 3,2 avec l'HCl (0,1 N). Un essai à blanc avec le réactif d'hydroxylamine seule a été réalisé de la même manière. Le réactif d'hydroxylamine a été préparé par dissolution de 25 g de chlorhydrate d'hydroxylamine dans 100 ml de NaOH (0,5 N) avant que le volume final ne soit ajusté à 500 ml avec de l'eau distillée. La teneur en carbonyle a été calculée comme suit (**Kuakpetoon et al., 2001**).

$$\% \text{ Teneur en carbonyle} = \frac{[(\text{Blanc} - \text{échantillon}) \text{ ml} \times \text{normalité d'acide} \times 0,028 \times 100]}{\text{poids de l'échantillon (poids sec) en g}}$$

II.2.4.2. Détermination de la teneur en groupements aldéhydes (2ème méthode de la teneur en carbonyle):

Le dosage de groupements aldehyde peut se faire par la solution d'hydroxyde de sodium en utilisant la phénolphtaléine comme indicateur selon la méthode écrite par **Liming Zang**. (**Liming Zang, 2011**).

Dans un erlenmeyer de 125ml, 0,15 g de pectine oxydée sont solubilisés dans 10 ml de NaOH (0,25M). Le tout est placé dans un bain marie à T=70°C pendant 2 min. Puis, il est refroidi à T=25°C pendant une minute. Ensuite, 15 ml d'acide sulfurique (0,125M), 30 ml d'eau distillée et 1ml de la phénolphtaléine (0,2%) sont ajoutés. Enfin, le dosage de la solution se fait avec de NaOH (0,25M) jusqu'à l'apparition de la couleur rose. On note le volume de NaOH correspondant au dosage. Le pourcentage de dialdéhyde est donné par la relation suivante :

$$DA = \frac{C_1 V_1 - 2C_2 V_2}{\frac{m}{173} 1000} \times 100\%$$

Avec :

C₁ : est la concentration de NaOH en (mol/l.);

C₂ : est la concentration de H₂SO₄ en (mol/l.);

V₁ : est le volume de NaOH en ml;

V₂ : est le volume de H₂SO₄ en ml;

173: est la masse molaire de l'unité répétitive d'acide galacturonique.

II.2.4.3. Détermination de la teneur en carboxyle:

La teneur en carboxyle de la pectine oxydée est déterminée selon un mode opératoire modifié de **Chattopadhyay et al.**, (**Chattopadhyay et al., 1997**). Deux grammes de pectine oxydée sont mélangés avec 25 ml de HCl (0,1 N) et la suspension est agitée occasionnellement pendant 30 min avec un agitateur magnétique et est ensuite filtrée sous vide et lavé avec 400 ml d'eau distillée. Le résidu de pectine est ensuite soigneusement transvasé dans un bécher de 500 ml, et le volume est ajusté à 300 ml avec de l'eau distillée. La suspension de pectine est chauffée dans un bain d'eau bouillante sous agitation continue

pendant 15 min afin d'assurer la gélatinisation complète. La dispersion chaude est ensuite ajustée à 450 ml avec de l'eau distillée et titrée à pH 8,3 avec NaOH (0,01 N).

Un essai à blanc est réalisé avec de la pectine non modifiée. Le contenu en carboxyle est calculé comme suit (**Kuakpetoon *et al.*, 2001**) :

$$\text{Milliéquivalents d'acidité/100 g de pectine} = [(\text{échantillon-Blanc}) \text{ ml} \times \text{normalité de NaOH} \times 100] \text{ poids d'échantillon (poids sec) en g}$$

$$\text{Pourcentage de la teneur en carboxyle} = [\text{milli-équivalents de l'acidité/100 g de pectine}] \times 0,045$$

II.2.5. Préparation des films à base du chitosane additionné à la pectine et/ou pectines oxydées:

II.2.5.1. Préparation des films solubilisés dans l'acide chlorhydrique:

Tous les films sont préparés en solubilisant la pectine et le chitosane séparément dans l'eau.

Au départ, la pectine est pesée puis versée dans un bécher. La solubilisation se fait en ajoutant l'eau sous une très faible agitation afin d'éviter la formation de bulles d'air. Le chauffage est ensuite mené jusqu'à 60°C. Le pH de la pectine est de 1,5.

Par ailleurs, la solubilisation du chitosane nécessite moins de temps et un chauffage à 60°C. Son pH est de 4.

Films réticulés par le glutaraldehyde

Après séchage, les films de chitosane seul sont détachés de leurs supports. Puis, ils sont posés dans des boîtes de pétri en verre afin de subir la réticulation par le glutaraldéhyde et cela à une concentration de 2%. 20 ml de la solution aqueuse de GTA sont versés sur les films déjà préparés. Au bout de 24 h, ils sont rincés plusieurs fois à l'eau distillée. Les films ainsi obtenus sont séchés dans du papier absorbant et placés entre deux plaques en verre pour éviter tout retrait.

Les formulations des mélanges chitosane/pectine et chitosane/pectines oxydées sont présentées comme suit:

- Chitosane 100% :
(CH/P) (100/0) (%);
- Chitosane/pectine:
(CH/P) (95/05) (%);
(CH/P) (60/40) (%);
(CH/P) (40/60) (%);
- Chitosane/pectine oxydée par le periodate:
(CH/POP) (95/05) (%);
(CH/POP) (60/40) (%);
(CH/POP) (40/60) (%);
- Chitosane/pectine oxydée par le chlore:
(CH/POCl) (95/05) (%);
(CH/POCl) (60/40) (%);
(CH/POCl) (40/60) (%);
- Chitosane réticulé par le glutaraldehyde :
(CH/GTA)(100/02)(%).

II.2.5.2. Préparation des films solubilisés dans l'acide lactique:

La préparation des films à base de chitosane solubilisé dans 2% de l'acide lactique se fait de la même manière que la méthode précédente mais la température reste ambiante pendant 6 heures.

II.2.6. Préparation des films à base de gélatine additionnée à la pectine et/ou pectines oxydées:

La préparation se fait en solubilisant la pectine et la gélatine séparément dans l'eau.

Au départ, la pectine est pesée puis versée dans un bécher. La solubilisation se fait en ajoutant l'eau sous une très faible agitation afin d'éviter la formation de bulles d'air. Le chauffage est ensuite mené jusqu'à 60°C. D'autre part, la solubilisation de la gélatine se fait à 40°C.

Les films sont conçus à partir de (gélatine/pectine) et/ou (gélatine/pectines oxydées) à un pH égal à 5.

La réticulation des films à base de gélatine a été faite de la même manière que celle du chitosane.

Les formulations des mélanges gélatine/pectine et gélatine/pectines oxydées sont comme suit:

- Gélatine 100%
(G/P) (100/00) (%);
- Gélatine/pectine:
(G/P) (95/05) (%);
(G/P) (60/40) (%);
(G/P) (40/60) (%);
- Gélatine/pectine oxydée par le periodate:
(G/POP) (95/05) (%);
(G/POP) (60/40) (%);
(G/POP) (40/60) (%);
- Gélatine/pectine oxydée par le chlore:
(G/POCl) (95/05) (%);
(G/POCl) (60/40) (%);
(G/POCl) (40/60) (%);
- Gélatine réticulée par le glutaraldehyde
(G/GTA)(100/02)(%).

II.2.7. Spectrophotométrie infrarouge (IR-TF):

a) Principe:

C'est une technique d'analyse utilisée pour l'identification des groupements fonctionnels (par l'apparition de bandes de vibration caractéristiques), le contrôle de la pureté, et l'analyse quantitatives des substances chimiques (par la hauteur des bandes) et qualitative (par la position des bandes). Elle représente également un moyen important dans l'étude des structures moléculaires. Les vibrations créent un champ électromagnétique de même fréquence.

Le phénomène d'absorption dans le domaine de l'infrarouge est causé par la vibration et la rotation des molécules.

Le domaine spectral de l'infrarouge se partage en trois régions : infrarouge proche, infrarouge moyen et infrarouge lointain.

Nombres

D'ondes ()	14000	4000	400	200 cm ⁻¹			
	<table><tr><td>IR proche</td><td>IR moyen</td><td>IR lointain</td></tr></table>				IR proche	IR moyen	IR lointain
IR proche	IR moyen	IR lointain					
Longueur	0.7	2.5	25	50µm			

D'onde ()

En ce qui concerne la caractérisation des composés organiques et notamment les polymères, l'enregistrement des spectres se fait dans la région de l'IR moyen qui lui-même se divise en deux parties:

- Première zone comprise entre 4000 et 1500 cm^{-1} , domaine des vibrations de valence caractéristiques des principales fonctions, facile à interpréter;
- Seconde zone située entre 1500 et 600 cm^{-1} , complexe et difficile à interpréter appelée zone des empreintes digitales. Cette région peut être utilisée avec profit dans certains cas (composés aromatiques, éther...) (**Hesse *et al.*, 1997**).

b) Appareil

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre à transformée de fourrier (FTIR) de type SHIMADZU 84005. Le spectre des films sont enregistrés directement alors que les poudres sont dissoutes à 3% (p/p) dans le KBr.

II.2.8. Radiocristallographie par diffraction des rayons X (DRX):

a) Principe:

Les rayons X sont diffusés sans perte d'énergie par des particules de la matière chargée électriquement, et principalement, par les électrons. Dans les solides cristallins, où les particules sont disposées de façon périodique, la quantité de rayonnement diffusé n'est importante que dans les directions pour lesquelles les rayons diffusés sont en phase. On dit alors qu'il y a diffraction (**Samake, 2008**).

L'observation d'un rayonnement diffracté est donc soumise à des conditions relatives à l'existence d'interférences constructives ou cohérentes. La loi de *Bragg* établit la condition essentielle à la diffraction, à savoir : deux rayons diffusés par un cristal sont en phase et

s'additionnent si la différence entre leurs chemins parcourus au sein du cristal est égale à n fois (n = nombre entier) leur longueur d'onde :

$$2 d_{hkl} \cdot \sin \theta = n$$

Avec

λ : la longueur d'onde du rayonnement utilisé ;

θ : l'angle de réflexion ;

d : la distance réticulaire entre deux plans atomiques adjacents d'une même famille ;

n : l'ordre de réflexion.

Cette relation permet, à partir des valeurs de l'angle d'incidence, de déterminer les équidistances des différentes familles de plans caractéristiques du matériau analysé (**Peroglio, 2008**).

b) Appareil:

L'appareil utilisé est un diffractomètre de type D 8-ADVANCE-BRUKER-AXS.

Les Rayons X sont produits par une anticathode de cuivre alimentée sous 40KV et 40mA. La radiation Cu_K ($\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$) séparée au moyen d'un monochromateur arrière en graphite courbé. Les fentes de divergence et d'antidiffusion sont programmables. Le diagramme des échantillons est enregistré sur un domaine angulaire compris: $5 - 60^\circ$ (2θ) par pas de 0,02. Le temps de comptage est de 1 seconde par pas. Le goniomètre vertical $\theta - 2\theta$ en géométrie *Bragg Brentano*. Le détecteur est à scintillation.

II.2.9. Test de solubilité et mesure de la turbidité:

Le test de solubilité est réalisé dans des tubes à essai en verre. La masse initiale de film à base de chitosane est de 0,04g. La solubilité se fait en fonction du temps (pendant 48h) à ($T=25^\circ\text{C}$ et 37°C) et dans trois milieux pseudophysiologiques différents. Les volumes de ces milieux sont fixés à 5ml.

Après 48h, on a mesuré la densité optique D.O (la turbidité) à une longueur d'onde égale à 600nm dans un densimètre DEX3MLAY.

Solution 1:

Eau distillée.

Solution 2:

C'est un milieu pseudo-fluide extracellulaire (PFEC) qui est similaire au fluide de blessure. Il est préparé par la dissolution de 0,68g de NaCl, 0,22g de KCl, 2,5g de NaHCO₃ et 0,35g de NaH₂PO₄ dans 100ml d'eau distillée. Le pH est à 8,2 (**Beljit et al., 2008**).

Solution 3:

C'est une solution tampon PBS couramment utilisée dans la recherche biologique. Il s'agit d'une solution saline contenant du chlorure de sodium, phosphate de sodium, chlorure de potassium et de phosphate de potassium.

La mémoire tampon permet de maintenir un pH constant. L'osmolarité et les concentrations d'ions de la solution correspondent généralement à ceux du corps humains (isotonique).

Une préparation commune est décrite comme suit:

Pour un litre d'une solution PBS utilisé, on additionne 8g de NaCl + 0,2g de KCl + 1,44g de Na₂HPO₄ + 0,24g de KH₂PO₄. On procède ensuite à leur dissolution dans 800 ml d'eau distillée. On ajuste alors le pH à 7,4 avec l'acide chlorhydrique (1N) ou NaOH (1N) et enfin, on ajoute l'eau distillée à un litre (**Beljit et al., 2008**).

II.2.10. Test de gonflement:

Ce test est évalué dans les mêmes milieux du test de solubilité. Les volumes de ces milieux sont fixés à 25ml.

Le gonflement est l'une des caractéristiques les plus importantes des gels. Il peut être expliqué par la pénétration graduelle de l'eau dans les particules solides, suivie par la plastification et ensuite, le gonflement (**Degenis, 1994**).

Les tests de gonflement sont réalisés dans des béchers en verre de 25 ml. On prend la masse initiale de films qui est de 0,08g. Les mesures du poids se font en fonction du temps à une température ambiante.

Le taux de gonflement exprimé en pourcentage massique "G" est calculé à partir de l'expression suivante:

$$G\% = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100$$

Où

M_t : Masse du film gonflé dans le solvant pendant un temps t ;

M_0 : Masse initiale de film (à $t=0$).

II.2.11. Détermination des amino-groupes libres:

Le nombre de groupes amino a été mesuré pour la gélatine seule et le mélange gélatine-pectine par titrage pH métrique (**Gómez-Mascaraque *et al.*, 2014**). Dans cette méthode, 25 ml d'une solution de HCl 0,1 N sont ajoutés en excès à environ 0,2 g de mélange gélatine-pectine, en laissant suffisamment de temps (20 h) pour charger tous les groupes de protons liants. Par la suite, la solution a été titrée avec une solution de NaOH 0,1 N avec suffisamment de temps entre chaque intervalle. La gélatine pure (0,2 g) a été dissoute dans l'HCl et titrée avec NaOH. Dans le cas de la présence des groupes amino libres deux étapes pourraient être distinguées (**Hoffmann *et al.*, 2009**). Le pourcentage de groupes amino est calculé par l'équation suivante:

$$NH_2 = \left[M_{NaOH} (V_2 - V_1) * \frac{146,19}{W} \right] * 100$$

dans lequel M_{NaOH} est la molarité de la solution de NaOH, V_1 et V_2 le volume pour neutraliser l'excès de HCl et les groupes amino protonés, 146,19 est le poids moléculaire de l'unité monomère de la lysine et W est la masse de l'échantillon à l'état sec avant le titrage (**Hoffmann *et al.*, 2009**).

La même chose pour le chitosane seul et le mélange, avec $M=161$ (le poids moléculaire de l'unité monomère du chitosane).

II.2.12. Dosage des protéines par l'acide Bicinchoninique (BCA):

a. Courbe d'étalonnage:

Le Kit est constitué d'acide bicinchoninique (BCA) et d'ions cuivriques en milieu alcalin. Les ions cuivreux générés par réduction par les protéines forment avec le BCA un complexe stable et intensément coloré ($\lambda_{max}=562nm$).

a.1. Préparation des solutions de BCA (working):

La solution *working* de BCA « W » est préparée par l'addition d'une part de réactif B «4% $CuSO_4$ » avec 50 parts du réactif A «BCA».

Dans notre cas, pour le tracé de la courbe d'étalonnage, on doit préparer la solution mère de 10ml de BCA mélangé à 0,2 ml de $CuSO_4$ à 4%. La couleur est verte claire.

a.2. Préparation de solution BSA (Bovin Sérum Albumine) à différents concentrations:

Le kit comprend une ampoule de BSA à une concentration de 1000µg/ml. Cette protéine (BSA) nous servira pour l'établissement de la courbe d'étalonnage.

Pour ce faire, cinq tubes à cinq concentrations différentes ont été préparés.

Pour le tube N°1: On prélève de l'ampoule de BSA (à 1000µg/ml) 0,1ml qu'on additionnera à 2ml de la solution *working*.

Pour le tube N°2: On prépare une solution de 800µg/ml, c'est-à-dire on prélève 0,1ml de l'ampoule et on lui rajoute 0,125ml d'eau distillée.

On prélève 0,1ml de la solution qu'on vient de préparer et on lui rajoute 2ml de la solution *working*.

Pour le tube N°3: On prépare une solution de 400µg/ml, c'est-à-dire on prélève 0,1ml de la solution de 800µg/ml et on lui rajoute 0,2ml d'eau distillée.

On prélève 0,1ml de la solution qu'on vient de préparer et on lui rajoute 2ml de la solution *working*.

Pour le tube 4 : On prépare une solution de 200µg/ml, c'est-à-dire on prélève 0,1ml de la solution 400µg/ml et on lui rajoute 0,2ml d'eau distillée.

On prélève ensuite 0,1ml de la solution qu'on vient de préparer et on lui rajoute 2ml de la solution *working*.

Pour le tube 5 : on prend 0,1ml de l'eau distillée avec 2ml de la solution *working*.

Tableau II.2. Les volumes précis du BSA et la solution «w» pour préparer la courbe d'étalonnage.

Tube	concentration de BSA (µg/ml)	Volume de BSA (ml)	Volume de la solution working «W» (ml)
1	1000	0,1	2
2	800	0,1	2
3	400	0,1	2
4	200	0,1	2
5	H ₂ O	0,1	2

Les tubes ainsi préparés sont placés dans un bain marie à 37°C pendant 30 min. On laisse refroidir à une température ambiante égale 25°C. La couleur des solutions varie selon la concentration de BSA. Si celle-ci est faible, la couleur sera bleue ; en revanche, une forte concentration donnera du violet.

L'absorbance est lue à une longueur d'onde égale 562 nm par rapport à l'eau distillée.

avec:

$$A_{\text{net } 1} = A_{\text{tube5}} - A_{\text{tube5}}$$

$$A_{\text{net } 2} = A_{\text{tube4}} - A_{\text{tube5}}$$

$$A_{\text{net } 3} = A_{\text{tube3}} - A_{\text{tube5}}$$

$$A_{\text{net } 4} = A_{\text{tube2}} - A_{\text{tube5}}$$

$$A_{\text{net } 5} = A_{\text{tube1}} - A_{\text{tube5}}$$

Les valeurs des absorbances à $\lambda_{\text{max}} = 562 \text{ nm}$ sont présentées dans le **tableau II.2**. Le tracé de la courbe d'étalonnage donne une droite (**figure II.3**).

b. Dosage des protéines libérés:

Les films à 0,5g de masse sont plongés dans 25 ml d'eau distillée et placés dans une boîte de pétri en verre, pour chaque 10 min on fait des prélèvements à T_{amb} .

Puis, 100µl de la solution sont prélevés. On lui ajoute 2ml de BCA «*Working*». Et on continue par le même mode opératoire qui a été suivi pour la construction de la courbe d'étalonnage.

Les tubes ainsi préparés à partir des différents films de: «G (100)%, G/P, G/POP, G/POCl et G/GTA» sont placés dans un bain marie à 37°C pendant 30 min. On laisse revenir à la T_{amb} .

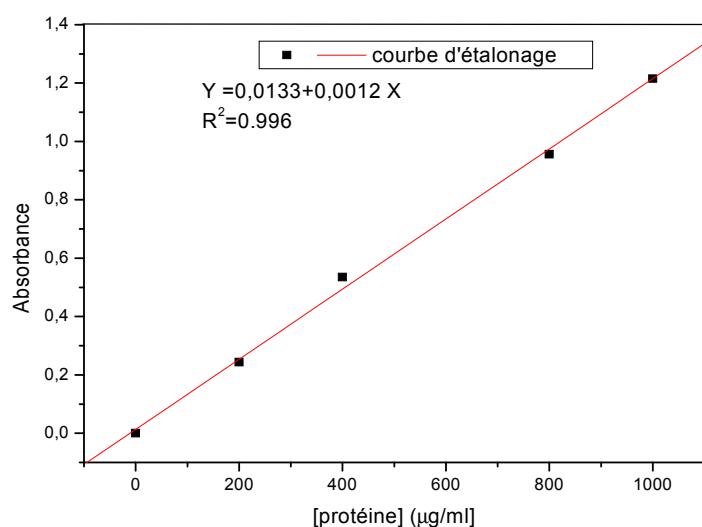


Figure II.1. Courbe d'étalonnage pour la détermination de protéines libérées à partir des films de (G/pectine) et (G/pectine oxydée).

II.2.13. Détermination du nombre de moles des -amino groupes et évaluation du taux de réticulation par le TNBS:

L'acide 2, 4, 6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) a été utilisé pour déterminer le nombre de groupements amino primaires dans les protéines, les peptides et les acides aminés par la formation d'un UV chromophore avec les résidus de la lysine et de l'hydroxylysine (**Bubnis, 1996; Biji et al., 2001**).

La réaction est représentée comme suit : (**Figure. II.4**)

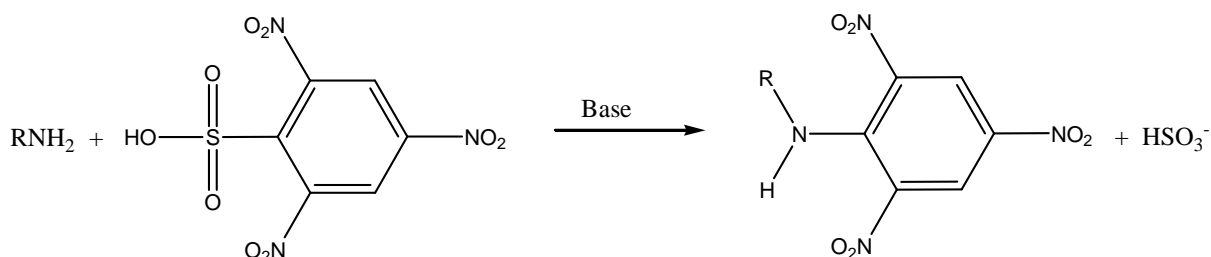


Figure II.2. réaction de l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique avec les groupements amino-protéines en milieu alcalin (**Ofner et al., 1992**).

L'équation suivante permet de déterminer le nombre de moles de groupements -amino par gramme de gélatine:

$$\frac{\text{Nombre de moles de groupes amino}}{\text{Gramme de gélatine}} = \frac{2.(\text{Absorbance})(0,02 \text{ litres})}{(1,46 \times 10^4 \text{ litre/mole.cm})(b)(x)} \quad (\text{Song, 1991}).$$

Où:

$1,46 \times 10^4$ litres / moles.cm: l'absorptivité molaire du TNP-Lys(trinitrophényllysine)

(b): l'épaisseur de la cuve de mesure en cm.

(x): la masse d'échantillon en gramme.

Le degré de réticulation est directement calculé à partir de l'équation ci-dessous : (**Schacht et al., 2000**).

$$\text{Degré de réticulation}(\%) = \frac{[1 - \text{absorbance du film réticulé}]}{\text{absorbance du film non réticulé}} \times 100(\%) \text{ (Ofner et al., 1996).}$$

Pour la réalisation de ce test, on mélange 11mg du film avec 1ml de NaHCO_3 (4% dans l'eau) et 1 ml de TNBS (0,5%). Le mélange est chauffé à 40°C pendant 4 heures.

Ensuite, 3ml d'HCl (6N) sont additionnés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 60°C pendant 2 heures. Afin de solubiliser et de dissoudre totalement le film, 5ml d'eau sont ajoutés. Une extraction est faite par 5 ml d'éther éthylique pour éliminer l'excès de TNBS restant ainsi que les groupes -aminés de trinitrobenzène qui n'ont pas réagi.

5ml de la phase aqueuse sont prélevés du mélange et chauffés pendant 15min dans un bain-marie afin d'évaporer l'éther résiduel. Puis, 15 ml d'eau ont été additionnés à la phase aqueuse (**Dubois, 2006; Biji et al., 2001**).

L'absorbance est mesurée à 346 nm.

Ce test a été fait sur tous les films préparés à base de gélatine, G/P; G/POP, G/POCl et G/GTA.

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre UV-VIS de type UNICAM Heliosx.

II.2.14. Biocompatibilité des films avec le sang humain:

Le potentiel hémolytique est la mesure de l'étendue de l'hémolyse qui peut être causée par le matériau quand il entre en contact avec le sang. Le potentiel hémolytique des hydrogels a été déterminé selon **O'Leary et Guess (Lihong fan et al., 2012)**. 0,1 ml du sang humain anticoagulé par le citrate sont ajoutés à 7,5 ml de PBS contenant 0,15g du gel dans différents tubes à essai. Un control positif (100% hémolysé induit par remplacement du PBS avec 7,5 ml de solution Na_2CO_3 0,1%) et un autre négatif (0% d'hémolyse, PBS sans ajout d'hydrogel) ont également été mis. Chaque série d'expériences est réalisée en double. Tous les tubes à

essai contenant les échantillons et les témoins sont incubés pendant 1 h à 37°C. Après incubation, les tubes sont centrifugés à 300 rpm pendant 5 min. Le pourcentage d'hémolyse est calculée en mesurant la densité optique (DO) de surnageant de la solution à 545 nm dans un UV/VIS-1700 spectrophotomètre selon la formule suivante:

$$\text{Hémolyse (\%)} = \left(\frac{DO \text{ de l'échantillon} - DO \text{ du control négatif}}{DO \text{ du control positif}} \right) \times 100.$$

II.2.15. Activité antioxydante:

II.2.15.1. Test de DPPH

L'effet scavenger des films à base du chitosane vis-à-vis du radical DPPH est évalué selon la méthode décrite par **Jieun et al.**, (**Jieun et al.**, 2013). Un volume de 2 ml de la solution méthanolique de DPPH (4%) est mélangé avec 0,6 ml des solutions de «chitosane, de pectine et du mélange» (20-10 mg/mL) ou des antioxydants standards (BHT et acide ascorbique) à différentes concentrations (le chitosane est solubilisé dans 1% d'acétate). Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm. Le pourcentage de l'activité anti-radicalaire est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle.

At : Absorbance du test.

La concentration effectrice (EC) définie comme la concentration de l'échantillon qui produit 50% d'effet piègeur du radical DPPH est déterminée.

II.2.15.2. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des films à base du chitosane, pectine, POCl, chitosane/pectine et/ou POCl est déterminé selon la méthode de **Topçu et al.**, (**Topçu et al.** 2007) avec quelques modifications. Différentes concentrations de films (2-0,125 mg/mL) ou de l'antioxydant standard (BHT) (0,5-0,025 mg/mL) sont mélangées avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanide de potassium [$K_3 Fe(CN)_6$] (1%). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 2,5ml de TCA (10%) sont ajoutés suivis de centrifugation à 3000 tours/min pendant 10 minutes.

2,5mL de surnagent, 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de $FeCl_3$ (0,1%) sont additionnés et l'absorbance est lue à 700 nm contre un blanc qui contient tous les réactifs sauf le $FeCl_3$. La

valeur EC est la concentration de l'échantillon qui correspond à une absorbance égale à 0,5 et est calculée à partir du graphe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

II.2.16. Activité antibactérienne:

Les mesures de l'activité antimicrobienne sont faites par la méthode de diffusion agar qui est décrite par **Bindu et al., (Bindu et al., 2010).**, en utilisant 4 types de bactéries ; deux de gram positif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) et deux de gram négatifs (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) sur tous les films.

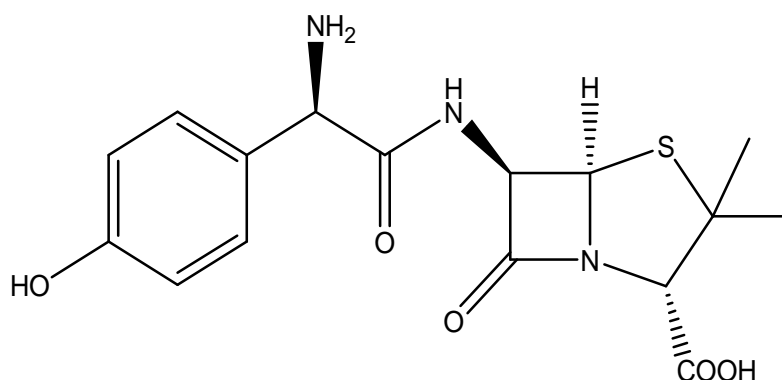
- **Bactéries:**

La bactérie est un micro-organisme ubiquiste, unicellulaire et sans noyau (procaryote) dont le génome est constitué d'ADN. Celui-ci consiste en un seul chromosome et on note éventuellement la présence de plasmides. L'ensemble des bactéries forme le règne des *Bacteria*.

Certaines bactéries peuvent être pathogènes. Chez l'homme, les symptômes d'une infection bactérienne sont similaires à ceux observés lors d'une infection virale (éruption cutanée, toux, écoulement nasal, larmoiement, fatigue, nausée, fièvre et douleurs musculaires). Parfois, elles sont mortelles. Les infections bactériennes sont traitées par les antibiotiques.

- **Amoxicilline:**

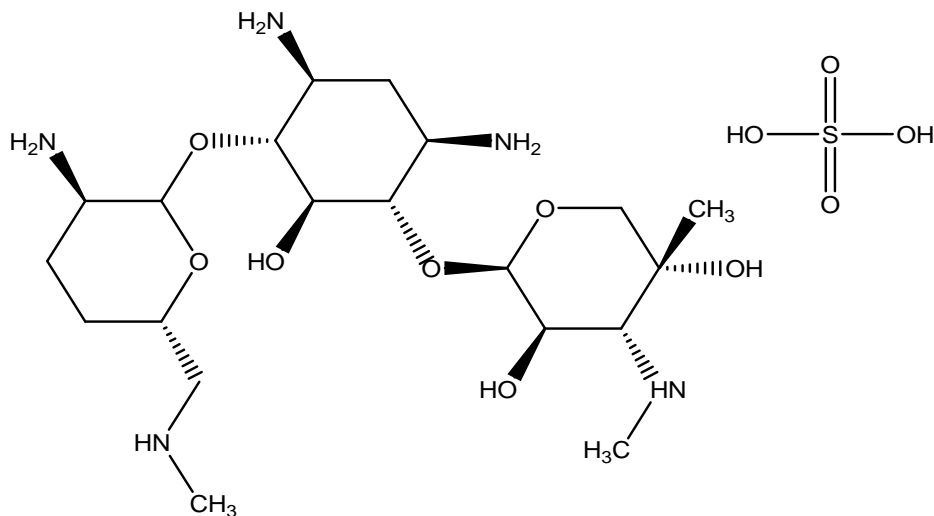
L'Amoxicilline $C_{16}H_{19}N_3O_5S$, dont le poids moléculaire est de 365 g/mol. C'est un antibiotique β -lactamine bactéricide de la famille des aminopénicillines indiqué dans le traitement des infections bactériennes à germes sensibles. Il est l'antibiotique le plus couramment utilisé, notamment chez les enfants, car elle présente une bonne absorption par voie orale, un spectre d'action antimicrobien large et un coût faible (**Pesnel et al., 1983**).



Amoxicilline.

- **Gentamicine:**

La gentamicine est un traitement antibiotique qui sert à lutter contre des infections bactériennes, surtout ORL, oculaires, urinaires, cutanées et pulmonaires. La gentamicine est un antibiotique de la classe des aminosides qui a pour particularité de ne pas pouvoir passer à travers la muqueuse intestinale. Elle ne peut donc être administrée que par injection intramusculaire ou intraveineuse (ou en collyre). La gentamicine est aussi intéressante car il est possible de l'injecter à des femmes enceintes quel que soit le terme de la grossesse. Les principaux effets indésirables de la gentamicine sont la toxicité rénale et auditive.

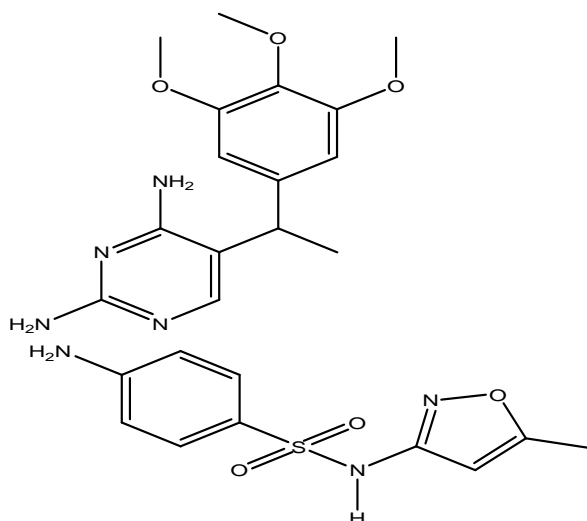


Gentamicine.

- **Triméthoprim / sulfaméthoxazole (Trim-sulfa):**

Triméthoprim / sulfaméthoxazole ou cotrimoxazole (BAN; abrégée SXT, TMP-SMX, TMP-SMZ, ou TMP-sulfamides) est un antibiotique utilisé dans le traitement d'une variété d'infections bactériennes, fongiques et à protozoaires. Il se compose d'une partie triméthoprim à 5 parties sulfaméthoxazole. Le médicament a été commercialisé dans le monde entier comme préparations génériques et sous plusieurs noms de marque, y compris Septra (GSK) et Bactrim (Roche). Co-trimoxazole est généralement considéré comme bactéricide, bien que ses composants soient individuellement bactériostatiques. Ses actions sont antifolique dans la nature, inhibant à la fois la biosynthèse de novo de l'acide folique et le métabolisme.

Il est sur la liste de l'Organisation mondiale de la Santé des médicaments essentiels, une liste des médicaments les plus importants nécessaires dans une base du système de santé.



Trim-sulfa

- **Préparation du milieu de culture:**

Le milieu de culture utilisé est la gélose Muller–Hinton, qui est le milieu microbiologique de croissance le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens. Sa composition est donnée dans le **tableau II.3**.

Il a quelques propriétés qui le rendent parfait pour l'utilisation d'antibiotiques. Tout d'abord, il s'agit d'un milieu non sélectif et non différentiel. C'est un nutriment pour les microorganismes étudiés. En outre, il contient de l'amidon. L'amidon est connu pour absorber les toxines libérées par des bactéries, de sorte qu'ils ne peuvent pas interférer avec les antibiotiques. Deuxièmement, il s'agit d'une gélose en vrac. Cela permet une meilleure diffusion des antibiotiques que la plupart des autres plaques. Une meilleure diffusion conduit à une zone plus fidèle de l'inhibition.

Tableau II.3. Composants du Gélose Muller – Hinton.

Composants	Concentration
Peptone de caséine	17,5 g/l
infusion de bœuf	2 g/l
Amidon	1,5 g/l
Agar	17 g/l
pH final: 7.4 +- 0.2	

La Préparation du milieu de culture se fait selon **Benzeggouta (Benzeggouta, 2005)**.

On met en suspension 38 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. On porte lentement le milieu à ébullition sous agitation constante jusqu'à l'obtention d'une solution qui est ensuite répartie dans des flacons.

La stérilisation se fait à l'autoclave à 115°C pendant 15 minutes. La solution est versée dans des boîtes de pétrie de telle façon à obtenir une couche de 4 mm.

- **Souches bactériennes et milieux de culture**

Les tests de l'activité antibactérienne ont été réalisés au niveau du Laboratoire des Microbiologies –Université de Sétif-1, El Bez.

Les bactéries sont conservées et maintenues en vie par des repiquages continus, sur divers milieux de culture solides et liquides, selon les espèces.

La concentration minimale bactéricide (CMB) des bactéries utilisées est de 10^6 .

- **Ensemencement**

On trempe un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne pour éviter la contamination du manipulateur et de la paillasse. Ensuite on l'essore en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. Puis, on frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. On répète l'opération deux fois, en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. On finit l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois (**Benzeggouta, 2005**).

CHAPITRE I :

LES BIOPOLYMÈRES

CHAPITRE II :

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE III :

RÉSULTATS ET DISCUSSION

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION GÉNÉRALE

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

CONCLUSION

ANNEXES

SOMMAIRE