



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTRE RE DE L'ENSEINEIGNEMT SUPERIEUR DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés

Mémoire de fin de cycle En vue de l'obtention du diplôme

Master en Génie des Procédés

Spécialité : Génie Alimentaire

Thème :

Préparation du chitosane à partir des carapaces de crevettes : étude et caractérisations

Présentée par :

M^{elle} BELHADDAD Massylia

M^{elle} BENHAMOUCHE khelidja

Composition de jury :

Mr FATMI Sofiane	MCA	Université de Béjaïa	Président
Mr AZZOUG Moufok	MCA	Université de Béjaïa	Examineur
Mme CHIBANI Nacera	MCA	Université de Béjaïa	Promotrice
Mme BOUARICHE Zakia	MAA	Université de Béjaïa	Co-Promotrice

Année Universitaire : 2020/2021

REMERCIEMENT

Nous remercions Allah et tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté de mener à terme ce présent travail.

Notre profonde et sincère gratitude est adressée à notre encadrant madame CHIBANI Nacera, pour avoir encadré ce modeste travail, pour sa disponibilité, sa gentillesse et tous ses conseils qui ont fait progresser ce travail. On remercie également notre co-encadrant madame Bouariche Zakia pour ces conseils et aussi madame Bensidhoum pour son aide. Nos vifs remerciements au président et aux membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'évaluer ce travail.

Enfin un grand merci à toute personne ayant contribué de près ou de loin dans l'élaboration de ce mémoire surtout les techniciens du laboratoire particulièrement ADRAR Kahina, KHELFOUNI Louiza et tout l'équipe et le personnel de l'université de Béjaia.

Dédicace

Je dédie ce travail

A

Mes chers parents ;

Mon très cher et unique frère ANIS ;

Ma chère binôme et mes amis pour tous les bons moments et délires qu'on a vécus ensemble durant ces 4 dernières années.

KHELIDJA

Dédicace

Je dédie ce travail

A

Mes chers parents ;

Mes sœurs SARAH et WISSAM ;

Ma chère binôme et mes amis pour tous les bons moments et délires qu'on a vécus ensemble
durant ces 4 dernières années.

MASSYLIA

Abréviations

Abs : Absorbance

Abs C : Absorbance de contrôle

Abs E : Absorbance d'échantillon

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

CHS : Chitosane

CaCO₃ : Carbonate de calcium

CaCl₂ : Chlorure de calcium

DD : Degré désacétylation

DA : Degré d'acétylation

DMF : Diméthylformamide

IRTF : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

IR: Infrarouge

LiCl : Chlorure de lithium

LPS : Lipopolysaccharide

PM : Poids moléculaire

M : Molarité

M/V : Masse/Volume

N : Normale

Liste des figures

Figure 1. Structure moléculaire de la chitine.....	6
Figure 2. Structure chimique du chitosane.....	8
Figure 3. Procédés d'obtention de chitine et de chitosane.....	16
Figure 4. Schéma du prétraitement des carapaces de crevettes.....	19
Figure 5. Les étapes de l'extraction de chitosane.....	20
Figure 6. Carapaces de crevettes avant et après la déminéralisation.....	21
Figure 7. Carapaces de crevettes après la déprotéinisation.....	22
Figure 8. Chitine extraite.....	23
Figure 9. Chitosane extrait.....	24
Figure 10. Spectrophotomètre Infrarouge.....	26
Figure 11. Presse hydraulique SHIMADZU.....	26
Figure 12. Etalement de la gélose Mueller-Hinton.....	29
Figure 13. L'état final des boîtes.....	29
Figure 14. Structure chimique du DPPH.....	30
Figure 15. Carapaces de crevettes pures.....	32
Figure 16. Chitine extraite.....	32
Figure 17. Chitosane extrait.....	33
Figure 18. Bande d'amide I et bande de référence d'OH.....	37
Figure 19. Dosage conductimétrique basique du chitosane.....	38
Figure 20. Taux de solubilité en fonction de la concentration d'acide acétique.....	39
Figure 21. Histogramme de l'activité antioxydante de chitosane (activité en % en fonction des différentes quantités de chitosane en mg).....	40
Figure 22. Photos du pouvoir antibactérien du chitosane par la méthode des disques.....	42
Figure 23. Histogramme de Diamètre d'inhibition en (mm) des souches pathogènes.....	42
Figure 24. Parois bactérienne des bactéries à Gram négatif (à gauche) et des bactéries à Gram positif (à droite) (E, Drouet).....	43

Liste des tableaux

Tableau 1. Domaines et applications de la chitine et du chitosane.....	16
Tableau 2. Produits chimiques utilisés.....	18
Tableau 3. Rendement de la réaction.	25
Tableau 4. Bandes d'absorptions caractéristiques de la chitine extraite	33
Tableau 5. Pics caractéristiques enregistrés dans le spectre du chitosane extrait	35
Tableau 6. Absorbances des échantillons et pourcentage d'activité antioxydante de chitosane	40
Tableau 7. Diamètre d'inhibition en (mm) des souches pathogènes	41

Table de matières

Symboles & Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
I.1. Biopolymères.....	3
I.2. Propriétés des biopolymères	3
I.2.1. Biodégradabilité	3
I.2.2. Perméabilité à la vapeur d'eau	4
I.2.3. Biocompatibilité et biorésorbabilité	4
I.2.4. Propriétés chimiques.....	4
II. Généralité sur la chitine	5
II.1. Historique	5
II.2. Définition et structure de la chitine	5
II.2.1. Structure chimique de la chitine	6
II.3. Caractéristiques physico-chimiques	6
II.3.1. Degré de N-acétylation	6
II.3.2. Solubilité	6
II.3.3. Poids moléculaire.....	7
II.4. Caractéristiques chimiques	7
II.5. Caractéristiques biologiques	7
II.5.1. Biocompatibilité.....	7
II.5.2. Biodégradabilité.....	8
III. Généralité sur le chitosane.....	8
III.1. Historique	8
III.2. Définition et structure chimique du chitosane	8
III.3. Propriétés du chitosane	9

III.3.1. Propriétés physico-chimiques	9
III.3.2. Propriétés chimiques.....	10
III.3.3. Propriétés biologiques.....	11
III.4. Méthodes d'extraction de la chitine et du chitosane	13
III.4.1. Méthode par voie chimique.....	13
III.4.2. Méthode par voie enzymatique.....	15
III.5. Domaines d'applications de la chitine et du chitosane.....	16
II. Matériels et méthodes.....	18
II.1. produits chimiques utilisés.....	18
II.2. Principe.....	18
II.3. Procédé d'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevettes.....	18
II.3.1. Déminéralisation (décalcification).....	21
II.3.2. Déprotéinisation.....	22
II.3.3. Blanchiment	23
II.3.4. Désacétylation	23
- Le rendement de la réaction	24
II.4. Caractérisation du chitosane	25
II.4.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	25
II.4.2. Détermination du degré de désacétylation.....	27
II.4.3. Test de solubilité de la chitosane	28
II.4.4. Etude et évaluations des propriétés antibactériennes.....	28
Chapitre III	32
III. Caractérisation du chitosane	32
III.1. Spectroscopie Infrarouge à Transformation de Fourier (IRTF).....	32
III.2. Détermination du degré de désacétylation (DD%)	36
-Par la méthode IRTF	36
-Par titrage conductimétrique.....	37
III.4. Test de solubilité	38
III.5. Activité antioxydante de chitosane	39

III.6. Activité antibactérienne	41
Conclusion.....	45

Introduction

Introduction

La crevette constitue le produit le plus valorisé sur le marché mondial (FAO. 2009). Destinée en sa totalité à l'alimentation humaine, la partie comestible représente près de 60% du poids de la crevette entière. La production de cette dernière augmente chaque année et les échanges internationaux sur ce produit de la mer sont les plus importants en valeur (Archer, 2007).

Les déchets des crevettes renferment plusieurs substances méritant d'être valorisées : On peut citer entre autres protéines, lipides, chitine et des éléments minéraux (Heu *et al.*, 2003).

La valorisation des coproduits permettrait en plus du respect de l'environnement, elle consiste à les transformer de façon à ce qu'ils deviennent des matières premières ou des matières intermédiaires pour la production des autres produits.

Les principaux produits à haute valeur ajoutée pouvant être engendrés par les coproduits de crevette, on retrouve deux produits la chitine et le chitosane. La chitine est le principal produit dérivé de ces coproduits. Elle est en effet un constituant majoritaire des carapaces du crustacé (17 à 33%). La chitine commerciale et le chitosane sont extraits des coquilles de crustacés comme les crevettes, par traitement chimique et biologique. A l'instar de la nature avec la génétique à ressources renouvelables et exploitables forment biocompatibilité biodégradabilité et non-toxicité ces polymères sont avec ricochet incontinent substances uniques présentant exclusif gouvernant passion et consubstantiel devoir gourmé jusqu'à l'homme intérêt défendue depuis la nature immédiatement substances qu'ils déclarent ils peuvent substance utilisés quelque la assimilation humaine et animal, la nutraceutique et la pharmacie, le cosmétique.... (Drevinskas *et al.*, 2017 ; Li *et al.*, 2016 ; Tan *et al.*, 2016).

Les objectifs de notre travail et des nombreux tests expérimentaux, réalisés au laboratoire, rentrent dans le cadre de la valorisation des coproduits de la crevette rouge, en exposant les différentes méthodes d'extraction de la chitine et du chitosane et de les caractériser, ensuite étudier l'activité antioxydante et antibactérienne du chitosane contre des germes pathogènes.

Le premier chapitre, présente une étude bibliographique portant sur le chitosane, et la chitine.

Le deuxième chapitre, représente la méthodologie utilisée à extraire la chitine et le chitosane, et leurs caractérisations.

Le troisième chapitre, nous présentons les résultats obtenus en caractérisant le chitosane extrait. Pour ensuite, étudier leur propriété en particulier le pouvoir antibactérien et antioxydant.

Chapitre I. Etude bibliographique

Chapitre I

La réalisation d'un projet nécessite toujours une synthèse bibliographique. Cette partie résume toutes les descriptions utiles à la meilleure connaissance des biopolymères, la chitine et du chitosane.

I. Généralité sur les biopolymères

I.1. Biopolymères

La définition du terme biopolymère est souvent sujette à controverse et il n'y a pas de distinction claire entre les « biopolymères », les « bioplastiques » et les « polymères biosourcés ». Selon l'UIPAC (L'union internationale de chimie pure et appliquée), Les biopolymères se définissent comme étant des biomacromolécules synthétisées par des organismes vivants. Et selon l'ADEME (Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie), les biopolymères sont des polymères naturels issus de ressources renouvelables de plantes, d'algues ou d'animaux. Les biopolymères peuvent aussi être obtenus par polymérisation de monomères naturels et par la fermentation des micro-organismes (**Crini, 2006**). La structure du matériau se simplifie pour finalement se convertir en H₂O, CO₂, CH₄ et/ou en une biomasse nouvelle et éventuellement un résidu non toxique pour l'homme et l'environnement (**Akiyama M et al., 2003**).

I.2. Propriétés des biopolymères

A cause de leur structure chimique, les biopolymères présentent des propriétés particulières et intéressantes pour des applications spécifiques en industrie plastique. Ils présentent les propriétés de biodégradabilité, de perméabilité à la vapeur d'eau, de biocompatibilité, de biorésorbabilité ainsi que des propriétés chimiques. Ces propriétés seront détaillées dans les sections suivantes (**Duikom Noutsa et al., 2012**).

I.2.1. Biodégradabilité

C'est la propriété la plus importante des biopolymères pour l'industrie plastique. Selon de nombreux auteurs, la biodégradabilité se traduit par une dégradation du matériau par des microorganismes comme les bactéries, les champignons et les algues. En d'autres termes, c'est une dégradation biotique qui met en jeu l'action des microorganismes par exemple par voie enzymatique, conduisant à une décomposition au niveau moléculaire et chimique. Il en résulte alors la formation de CO₂, H₂O en présence d'oxygène (ou la formation de CH₄, CO₂, H₂O en anaérobie) et une nouvelle biomasse.

La biodégradabilité de la plupart des biopolymères est due à la présence de liaisons facilement clivables comme les liaisons esters ou amides, conduisant à la formation de molécules simples et de fragments de plus petites tailles, assimilables par les microorganismes pour leur biosynthèse.

I.2.2. Perméabilité à la vapeur d'eau

Ces propriétés sont dues notamment à la présence de fonctions polaires hydroxyle et/ou amine qu'ont une forte réactivité avec l'eau par formation de ponts hydrogènes. La perméabilité à la vapeur d'eau pourrait être un inconvénient pour les emballages alimentaires de produits qui ne peuvent pas se trouver dans un endroit trop humide pour conserver leur fraîcheur. Par contre, cette propriété est avantageuse pour les emballages des produits frais (fruits et légumes) , car en évitant les condensations, la durée de conservation des produits frais est prolongée.

I.2.3. Biocompatibilité et biorésorbabilité

Un matériau biocompatible est un matériau qui est capable d'assurer une fonction avec une réponse appropriée et sans effet indésirable sur l'environnement biologique dans lequel il est appelé à fonctionner. La réponse biologique d'un matériau dépend de 3 facteurs : ses Propriétés, la caractéristique de l'hôte et la demande fonctionnelle pour le matériau. Les biopolymères par leur origine naturelle remplissent logiquement cette fonction et les implants médicaux en polyéthylène sont de plus en plus remplacés par des polymères d'origine naturelle.

En plus de la biocompatibilité, des matériaux biorésorbables sont également recherchés pour des applications médicales spécifiques. Ce type de matériau peut se décomposer tout naturellement dans l'organisme humain pour être remplacé par la suite par un tissu vivant. Les biopolymères se dégradent naturellement dans l'organisme humain par hydrolyse (enzymatique) et libèrent des molécules assimilables et non toxiques. La biorésorbabilité des polymères joue un rôle important en pharmaceutique pour les médicaments à libération contrôlée. (Valentina Siracusa et al., 2008).

I.2.4. Propriétés chimiques

La présence des fonctions chimiques sur les molécules leur attribue des propriétés particulières et des facilite a réagir avec d'autres molécules. Leur réactivité est due à la présence des fonctions alcool, acide, amine ou aldéhyde qui réagissent facilement grâce à leur site nucléophile et électrophile. La présence de certaines insaturations et des groupements

hydroxyles sur les chaînes alkyles des triglycérides permet leur fonctionnalisation et conduit à la formation de polyuréthanes, polyamides ou polyesters.

L'existence de stéréo-isomères due à la présence de carbone asymétrique sur certains biomonomères comme l'acide lactique influence les propriétés physiques des polymères. De plus, la présence des fonctions chimiques sur les molécules peut être mise à profit pour élaborer de nouveaux matériaux ou pour modifier les propriétés physiques et mécaniques des biopolymères ainsi que leurs applications. (**Valentina Siracusa et al.,(2008)**).

II. Généralité sur la chitine

II.1. Historique

En 1811, le chercheur français Henri BRACONNOT a isolé pour la première fois, à partir des parois cellulaires des champignons, la chitine. Il appela cette substance «fungina» (**Arbia, 2010**). En 1823, en étudiant la cuticule de l'exosquelette d'un coléoptère, un produit insoluble, Auguste ODIER a extrait ce même polymère et le nomma «chitine», terme dérivé du grec, qui signifie tunique ou enveloppe (**Randrianasolo, 2003**). ODIER publia un article sur les insectes dans lequel il avait noté que la chitine est présente aussi bien dans la structure des insectes que dans celle des plantes. La chitine, un polymère qui est le principal constituant structural de l'exosquelette des arthropodes comme les crustacés et les insectes. En 1843, LASSAIGNE a démontré la présence de l'azote dans la chitine. En 1878, LEDDHEROSE a pu démontrer que la chitine était naturellement synthétisée à partir du glucosamine et de l'acide acétique. La production de la chitine a débuté en 1920, mais la structure des biopolymères (chitine et chitosane) n'a été identifiée que 50 ans plus tard à travers la cristallographie et la spectroscopie infrarouge. A partir de 1948, MATSUSSIHMA déposait un brevet d'invention pour la production de glucosamine à partir de carapaces de crabes. Mais ce n'est qu'à partir des années 1970 que ces polymères ont suscité un réel intérêt (**Zemmouri, 2008**). Depuis 1992, un groupe de chercheurs sur la chitine et le chitosane de l'université de Liège a travaillé sur la mise au point d'un procédé innovant et non polluant.

II.2. Définition et structure de la chitine

La chitine est un polymère formé d'une répétition d'unités de N-acétyl-D-glucosamine, de formule brute $(C_8H_{13}NO_5)_n$. C'est un biopolymère linéaire à chaîne normale proche de la cellulose. La chitine est après la cellulose, le second polysaccharide le plus abondant dans la nature (**Randrianasolo, 2003**). La chitine est l'un des principaux composants de

l'exosquelette des insectes et autres arthropodes (crustacés, arachnides, etc.) (**Le Devedec, 2008**). Il faut savoir que la chitine n'existe pas sous une forme pure dans la nature : elle est toujours mélangée à d'autres substances (protéines, lipides et des produits minéraux comme le CaCO_3 et pigments).

II.2.1. Structure chimique de la chitine

La chitine ou poly N-acétyl-D-glucosamine est un polysaccharide dont les unités sont liées entre elles par des ponts β -1,4 glycosidiques. Elle est naturellement désacétylé au-dessus de 5% et plus (**Mourad, 2012**).

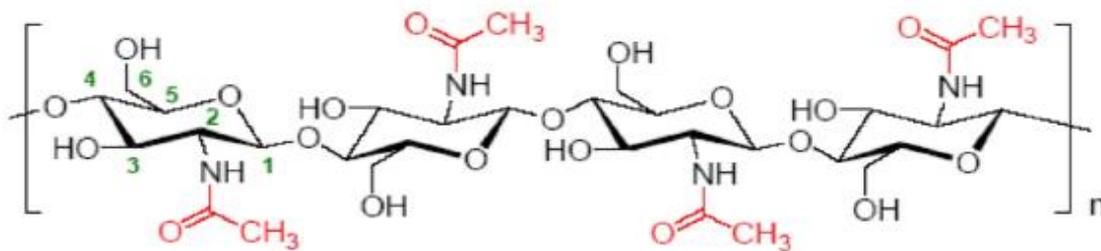


Figure 1. Structure moléculaire de la chitine (**Mourad, 2012**).

II.3. Caractéristiques physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques de la chitine sont très fortement dues aux caractères polysaccharidiques des polymères. La chitine est caractérisée par son degré d'acétylation, par sa masse molaire, et sa solubilité.

II.3.1. Degré de N-acétylation

Le degré d'acétylation (DA) est un paramètre fondamental qui influence sur les propriétés des biopolymères chitineux (**Arbia, 2010**). Pour étudier la structure chimique, les propriétés des copolymères, il est important de déterminer le DA. Il est défini comme étant le nombre d'unités de glucopyranose de la chaîne de biopolymère ayant un groupement N-acétyl. Lors du processus d'extraction de la chitine 5 à 15% de désacétylation est provoqué par le traitement alcalin, on parlera de la chitine lorsque le DA est supérieur à 50% (**Mignotte et al., 2012**).

II.3.2. Solubilité

Du point de vue chimique, la chitine est insoluble aussi bien dans l'eau que dans des solvants usuellement utilisés pour la cellulose. Elle est insoluble dans les acides dilués, les bases concentrées ou diluées et les solvants organiques les plus courants. Mais elle est soluble dans le mélange diméthylformamide (DMF)/chlorure de lithium (LiCl) ou diméthylacétamide

(DMAc)/LiCl. Elle est également soluble dans l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, l'acide acétique et l'acide phosphorique à 78-97%. Cependant, la solubilité dépend de la source de chitine (**Crini et al., 2009**).

II.3.3. Poids moléculaire

L'un des facteurs important pour la caractérisation de la chitine, est son poids moléculaire. Mais la détermination de la masse molaire nécessite la mise en solution du polymère (**Randrianasolo, 2003**). La masse molaire initiale de la chitine est de l'ordre de 800 000 à 106 g/mol et elle est en général acétylée. La connaissance de tel paramètre est nécessaire pour les usages industriels (voir les applications de la chitine). Il varie entre 1,03 et 2,5 MDa. Le pourcentage d'azote dans la chitine représente environ de 6,89% de sa masse moléculaire (**Arbia, 2010**). Sa masse molaire moyenne est de (203,19) n. où n représente le degré dépolymérisation.

II.4. Caractéristiques chimiques

L'hydrolyse en milieu basique de la chitine permet de donner le chitosane. La présence des doublets électroniques sur l'atome d'oxygène et l'atome d'azote de l'amide procure à la chitine la faculté d'être un substituant nucléophile et peut générer des réactions de substitution nucléophile sur des sites électrophiles.

Exemple : synthèse du N, O-Carboxymethyl chitine (NOCC) par la réaction de substitution nucléophile.

II.5. Caractéristiques biologiques

Biologiquement, la chitine présente les caractéristiques suivantes : non toxique, biodégradable, biorésorbable, biocompatible : (ayant une compatibilité remarquable avec le tissu de l'être vivant), anticoagulant, cicatrisant, bactériostatique, agent hydratant (elle apporte de l'eau et évite la déshydratation), capteur efficace des métaux lourds intéressant vis-à-vis des peaux allergiques, excellente tolérance, action sur la régénération cellulaire (**Zemmouri H, 2008**).

II.5.1. Biocompatibilité

La chitine n'a aucun caractère antigénique, c'est pourquoi elle est biocompatible avec les tissus vivants.

II.5.2. Biodégradabilité

La chitine est biodégradable, elle est hydrolysée par une série d'enzymes telles les chitinases, le lysozyme et les glucanases. Une des dérivés de la chitine la plus connue et qui suscite de nombreux intérêts est le chitosane.

III. Généralité sur le chitosane

III.1. Historique

Charles ROUGET a découvert le «chitosane», dérivé de la chitine en 1859, alors qu'il chauffait la chitine avec du KOH concentré à température élevée, il a pu donc démontrer que certains traitements chimiques sur la chitine, pouvaient la modifier. En 1894 Hoppe-Seyler a nommé le chitosane, «la chitine modifiée». Le chitosane, dérivé désacétylé de la chitine, est un polysaccharide non ramifié du type poly- β (1-4)-D-glucosamines partiellement acétylé. Tandis que la chitine est produite largement par un grand nombre d'organismes vivants (Assaad E, 2006).

III.2. Définition et structure chimique du chitosane

Le chitosane est un polysaccharide formé des copolymères de glucosamine et N-acétylglucosamine. Le chitosane est obtenu par N-désacétylation partielle de la molécule de chitine. Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine, principalement des carapaces de crustacés (Crini et al., 2009). Leur structure chimique représentée sur la figure 2, résulte de l'enchaînement d'unités de répétition N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine liées en β (1 \rightarrow 4). Le degré d'acétylation (DA) différencie la chitine du chitosane. Bien que le terme «chitosane» soit habituellement limité à toute chitine suffisamment N-déacétylée pour être soluble en milieu acide dilué, il n'existe pas de nomenclature officielle proposant la limite précise entre les deux termes. En conséquence, tout échantillon avec des degrés d'acétylations résiduels (DA) \leq 30% est nommé chitosane.

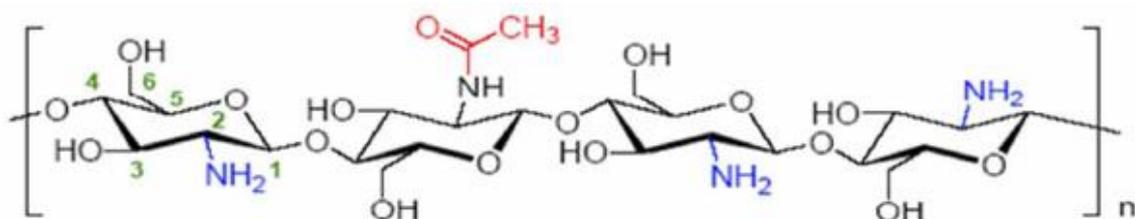


Figure 2. Structure chimique du chitosane (Mourad, 2012).

III.3. Propriétés du chitosane

III.3.1. Propriétés physico-chimiques

Le chitosane est caractérisé physico-chimiquement par le degré de désacétylation, la masse moléculaire, la viscosité et la solubilité (**Arbia, 2010**).

III.3.1.1. Degré de désacétylation (DD)

Le degré de désacétylation de la chitine influe sur toutes les caractéristiques physico-chimiques du chitosane (masse moléculaire, viscosité, solubilité...). Le DD est la plus importante caractéristique du chitosane. Il existe quatre (04) méthodes de techniques d'analyses pour déterminer le DD (**Moukrani, 2013**):

- Balayage par spectrophotomètre UV
- Dosage FTIR
- Dosage conductimétrique
- Dosage pH-métrique

En général, une seule méthode analytique ou spectrométrique n'est pas suffisante pour caractériser les biopolymères chitine et chitosane. Le DD de la chitine varie de 60% à 100% selon les conditions de désacétylation utilisées (**Mourad, 2012**).

III.3.1.2. Viscosité

Seul ici le chitosane est concerné par la viscosité en solution la chitine étant insoluble. La viscosité du chitosane dans une solution diluée d'acide acétique demeure très variable. Elle dépend notamment de quatre paramètres (**Randrianasolo, 2003**) :

- Degré de désacétylation: plus il est désacétylé, plus le nombre de groupement amine libre augmente entraînant ainsi une augmentation de sa solubilité et une grande viscosité
- Concentration : la viscosité croît en fonction de la concentration
- Température : la viscosité diminue lorsque la température augmente, comme pour tous les autres polysaccharides
- PH : la viscosité est forte dans les domaines de pH acide
- Masse molaire

Il existe différentes méthodes pour déterminer la viscosité. La plus employée est «le viscosimètre».

III.3.1.3. Masse molaire

Les chitosanes obtenus industriellement ont une masse molaire de l'ordre de 200 000 g.mol⁻¹ et un DA allant de 2 à 25% (**Marie Beatrice, 1998**). Pour le chitosane la masse molaire et la répartition des motifs N-acétylés, le long de la chaîne sont dépendantes de la méthode de désacétylation utilisée.

III.3.1.4. Solubilité

Le chitosane sous forme d'amine libre reste insoluble dans l'eau, dans les acides concentrés, dans les bases et dans les solvants organiques. Mais il est soluble dans les acides dilués dans des mélanges d'eau-alcool. Sa solubilité varie en fonction du degré de désacétylation et de la méthode de désacétylation mise en œuvre.

III.3.2. Propriétés chimiques

III.3.2.1. Caractère acido-basique

Le chitosane est soluble dans les acides dilués grâce à la protonation de ses groupements fonctionnels amines. En fait, la solubilité du chitosane dans différentes solutions dépend de sa forme acido-basique. A titre indicatif, les solubilités caractéristiques du chitosane se présentent : sous forme d'amine libre (R-NH₂), soluble dans les solutions acides, insoluble à pH>6,5, solubilité limitée dans H₃PO₄, insoluble dans H₂SO₄, insoluble dans les solvants organiques, sous forme d'amine cationique (R-NH₃⁺), soluble à pH<6,5 avec une consistance visqueuse, les solutions forment des gels avec des polyanions, soluble dans des mélanges d'eau- alcool. La constante d'acidité pKa de la forme amine cationique R- NH₃⁺ dépend du degré de désacétylation et du degré de neutralisation du groupe NH₃⁺ correspondant (**La Fleur, 2008**).

III.3.2.2. Formation de complexe (agent de chelation)

Le chitosane a une propriété complexant il est complexé avec les ions métalliques. En fait, le chitosane est connu pour posséder de bonnes propriétés chélatantes (**Mignotte et al., 2012**); les groupements amines -NH₂ retrouvés sur les chaînes saccharidiques montrent de fortes interactions avec les ions métalliques. La présence de groupements amine libre et de groupements hydroxyle, porteur de doublets libres d'électrons permet à la molécule de

chitosane de former des complexes de coordination avec la majorité des cations métalliques (Pb^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , etc.) pour lesquels ils jouent le rôle de collecteur.

III.3.3. Propriétés biologiques

Le chitosane est biocompatible, biodégradable, renouvelable, filmogène, agent hydratant, non toxique, bonne tolérance biologique, hydrolysé par le lysozyme donc biorésorbable, cicatrisant, agent bactéricide et fongicide.

III.3.3.1. Biocompatibilité

Le chitosane est un copolymère normal, parfaitement compatible avec le tissu vivant

(Durand et al., 2010).

III.3.3.2. Biodégradabilité

Les enzymes chitinase et chitosanase font dégrader la chitine et le chitosane en oligopolymères facilement assimilables par l'organisme des êtres vivants **(Durand V et al., 2010).**

III.3.3.3. Cicatrisant

Les films formés par le chitosane sont perméables à l'air. Cet avantage lui facilite essentiellement la régénération cellulaire tout en protégeant les tissus cellulaires contre l'attaque des microbes. En plus, le chitosane dispose d'un effet biostimulant sur la régénération de ces tissus **(Zemmouri H, 2008).**

III.3.3.4. Activité antimicrobienne du chitosane

Le chitosane présente une activité antimicrobienne face aux différents groupes de microorganismes, bactéries, virus, champignons, et levures **(Sagoo et al., 2002 ; Juneja et al., 2006 ; Chien et al., 2006 ; Rodriguez et al., 2003).** En général, les moisissures et les levures sont les plus sensibles au chitosane suivies des bactéries. Seule, la fraction soluble en milieu acide (pH 5,5) présente une capacité antimicrobienne aux pH supérieures, le biopolymère est insoluble ce qui se traduit par une perte drastique de son efficacité **(Qin et al., 2006).** L'activité antibactérienne du chitosane est influencée par de nombreux facteurs incluant l'origine biologique du chitosane, le pourcentage de désacétylation, le degré de polymérisation ou le poids moléculaire (PM) **(Kendra et al., 1984).**

De plus, le degré de l'effet antimicrobien et le mode d'action varient en fonction de l'organisme ciblé (Gram+/Gram-). La réponse du microorganisme dépend de la structure

chimique du chitosane utilisé et des conditions environnementales lors de l'interaction (Cuero, 1999).

Les propriétés fonctionnelles du chitosane sont influencées par le matériel brut utilisé pour sa production et peuvent varier aussi en fonction des espèces, mais également au sein d'une même espèce au cours de variations saisonnières, le chitosane provenant de crustacés démontre des mécanismes antibactériens plus diversifiés que le chitosane d'origine microbienne (Cuero, 1999). Plus le chitosane est désacétylé, plus son activité antimicrobienne est forte (Cuero, 1999), indiquant que les groupes fonctionnels pour l'inhibition de la croissance sont les groupes aminés cationiques (Jumaa *et al.*, 2002 ; Stössel *et al.*, 1984). Et aussi, plus la concentration en polymères de chitosane est élevée plus l'activité antimicrobienne est observée (Zheng *et al.*, 2003 ; Sekiguchi *et al.*, 1994). La littérature scientifique (Kong *et al.*, 2010 ; Eaton *et al.*, 2008 ; Zakrzewska *et al.*, 2005 ; Sudarshane *et al.*, 1992 ; Savard *et al.*, 2002 ; Rabea *et al.*, 2003 ; Zivanovic *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 1996) abonde pour nous donner des hypothèses sur les différentes interactions possibles entre les bactéries et le chitosane, et plus généralement sur le rôle antimicrobien de ce polymère :

- Le chitosane de par sa nature cationique interagirait avec la paroi cellulaire anionique des micro-organismes (interactions électrostatiques), le chitosane adhère facilement aux cellules microbiennes puisque les amines chargées positivement agissent avec les charges négatives sur la membrane des cellules libérant ainsi les constituants intracellulaires.
- Le chitosane pourrait chélater des ions métalliques nécessaires à la croissance microbienne ou à la production de toxines.
- Le chitosane pourrait former une liaison spécifique avec les macromolécules du micro-organisme (protéines, électrolytes, ADN, etc.).
- Le chitosane interagit avec la membrane des cellules pour altérer sa perméabilité entravant ainsi l'entrée de certains nutriments.

III.3.3.5. Activité antioxydant du chitosane

L'un des principaux problèmes de l'industrie agro-alimentaire est d'assurer la conservation des aliments. Les phénomènes d'oxydation sont notamment redoutés. En effet, au niveau des lipides, les dégradations oxydantes conduisent à une perte en vitamines, une diminution de la valeur nutritionnelle (acides gras essentiels), une détérioration du goût (composés volatils à

flaveur caractéristique, rancissement) et même parfois à l'apparition de substances toxiques (Pascal, 1979).

L'utilisation du chitosane comme antimicrobien, notamment dans les filières viandes et poissons, peut être justifié par son pouvoir antioxydant plus récemment identifié. Les mécanismes mis en jeu dans cette activité antioxydante du chitosane et surtout de certains de ses dérivés comme le carboxyméthylchitosane sont encore assez mal décrits et semblent être liés d'une part au caractère cationique de ces macromolécules et d'autre part à leur pouvoir chélateur. Ainsi le carboxyméthylchitosane en chélatant le fer libre issu des hémoprotéines libérées lors du stockage et/ou de la préparation de la viande va fortement ralentir le pouvoir catalyseur de ces ions sur le rancissement. L'action stabilisatrice des fonctions amines du chitosane sur les aldéhydes volatiles issus de la dégradation des acides gras insaturés semble également primordiale (Aljawish, 2013).

Le paragraphe suivant montre les étapes à suivre lors de l'extraction de la chitine et du chitosane.

III.4. Méthodes d'extraction de la chitine et du chitosane

La chitine est obtenue à partir de carapaces des crustacés, déchets de l'industrie alimentaire. Les carapaces sont traitées avec de l'acide pour la déminéralisation puis avec une base pour éliminer les protéines. Le résidu obtenu constitue la chitine. Il existe deux méthodes d'extraction de la chitine et du chitosane (Le Roux, 2012) :

- Extraction par voie chimique
- Extraction par voie enzymatique

Dans ce travail, on va surtout privilégier l'extraction par voie chimique.

III.4.1. Méthode par voie chimique

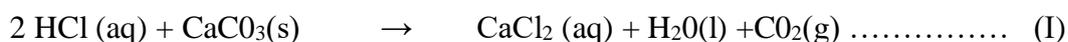
La production de chitine repose sur la purification de la matière première et l'élimination du carbonate de calcium et des protéines. L'extraction chimique consiste en un traitement acide pour la déminéralisation et un traitement alcalin pour la déprotéinisation. Il est important de bien préparer la matière première pour ne pas dégrader la chitine. Il y a quatre étapes à suivre dans le procédé d'extraction de la chitine et du chitosane, à savoir :

- La déminéralisation
- La déprotéinisation

- Le blanchiment
- La désacétylation et la dépolymérisation

III.4.1.1. Déminéralisation

La déminéralisation de la chitine s'effectue habituellement avec une solution d'acide diluée. Le traitement acide élimine les minéraux. On utilise généralement du HCl, afin de transformer les minéraux non solubles de la carapace en sels solubles (principalement des carbonates et des phosphates). Le carbonate de calcium, principal composé minéral de la carapace réagit avec le HCl pour former du chlorure de calcium, de l'eau et du gaz carbonique comme décrit dans la réaction (I) suivante (**Duval, 2008**) :



Puis, les sels formés sont séparés de la chitine par filtration suivie de lavage. La réaction avec le carbonate de sodium est achevée lorsque le dégagement de CO₂ cesse.

III.4.1.2. Déprotéinisation

Un traitement basique permet d'éliminer les protéines par solubilisation. La déprotéinisation de la chitine a pour principe de solubiliser les protéines dans la chitine dans une solution aqueuse, de manière douce ou sévère. Les carapaces des crustacés sont broyées puis les protéines ainsi qu'une partie des colorants naturels sont extraits par une solution de soude ou de potasse. Le réactif le plus adéquat est l'hydroxyde de potassium (KOH) (**Mourad, 2012**). Mais il est préférable d'utiliser l'hydroxyde de sodium (NaOH) pour des raisons d'économie et technique.

III.4.1.3. Décoloration ou dépigmentation

La coloration des produits peut être due par implication des groupes azotés et les aldéhydes voire réaction de Maillard. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) un agent de blanchiment courant peut être mélangé avec du HCl (**Duval, 2008**). En effet, tout comme les deux précédentes étapes les conditions de décoloration induisent une altération de la structure de la chitine, qui se traduit par une réduction du poids moléculaire. Les autres agents de blanchiment sont l'hypochlorite de sodium (NaClO), le permanganate de potassium (KMnO₄), l'acétone, l'éthyle-acétate et l'acide oxalique. Le peroxyde d'hydrogène est utilisé pour hydrolyser le chitosane afin d'augmenter sa solubilité et privilégie l'éthanol pour le blanchiment (**Monette et al., 2007**).

III.4.1.4. Désacétylation et la dépolymérisation

L'étape la plus délicate sur la préparation du chitosane à partir de la chitine est la désacétylation. Elle nécessite la réduction de la longueur de la chaîne du polymère c'est-à-dire, la substitution des groupements acétyles pour aboutir au chitosane (**Crini et al. 2009**). Il est possible d'obtenir différents chitosanes à partir d'une même chitine, en variant la durée de la désacétylation et/ou la température de la désacétylation (**Mignotte et al., 2012**).

Des traitements acides et basiques sévères catalysent la dépolymérisation et la désacétylation et aboutissent au chitosane et aux oligosaccharides. La désacétylation se fait par une solution de soude concentrée ou de potassium concentré ensuite le chitosane obtenu peut de nouveau être dissout dans une solution d'acide organique afin de le purifier.

III.4.2. Méthode par voie enzymatique

III.4.2.1. Voie fermentaire

Le principe consiste à faire usage d'enzymes et de bactéries par exemple, *Pseudomonas aeruginosa*K-187 source traditionnelle pour la production de protéases, chitinases et lysozymes (**Le Roux. 2012**). L'intérêt est de fermenter les coproduits des crustacés.

III.4.2.2. Déprotéinisation et déminéralisation enzymatiques

Les enzymes sont largement exploitées par les industries, en particulier les protéases. Leur activité principale est la lyse des liaisons peptidiques. Elles ciblent également les liaisons esters.

III.4.2.3. Désacétylation et dépolymérisation enzymatique

On utilise de chitinases ou chitosanylases pour la désacétylation enzymatique. La dépolymérisation enzymatique ou chitinolyse est plus spécifique et plus contrôlable que la dépolymérisation chimique (**Le Roux, 2012**). Les chitinases et chitosanases hydrolysent les liaisons glycosidiques.

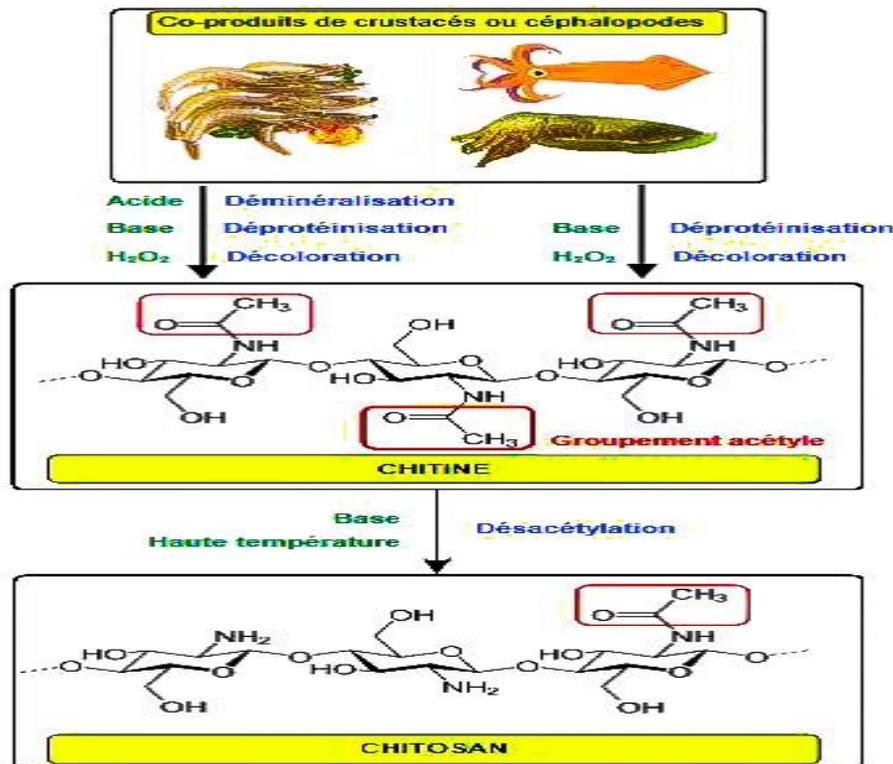


Figure 3. Procédés d’obtention de chitine et de chitosane.

Les domaines d’applications de la chitine et celles du chitosane sont cités dans le paragraphe ci-dessous :

III.5. Domaines d’applications de la chitine et du chitosane

La chitine et le chitosane suscite d’un réel intérêt dans divers domaines : l’agriculture, l’agroalimentaire, la médecine, le traitement d’eaux usées, le cosmétique,.... etc. Le tableau suivant cite quelques intérêts :

Tableau 1. Domaines et applications de la chitine et du chitosane

Domaines	Applications
Agriculture	Mécanisme défensif, Stimule la croissance des plantes, Enrobage (protection), Libération de fertilisants et nutriments, inducteur des mécanismes de défense des plantes, engrais, activateurs de croissance et de germination (Randrianasolo, 2003).

Agroalimentaire	Conservateurs et additifs alimentaires (Le Devedec, 2008).
Alimentaire	Non digestible (diète aux fibres) Hypocholestérolémiant, Agent de conservation Stabilisateur, Antimicrobien, Enrobage, protecteur (fruits), adjuvants alimentaires comme épaississants (Le Roux, 2012).
Biomédical	Sutures chirurgicales, Implants dentaires, Peaux artificielles, Reconstructions osseuses (Assaad, 2006).
Biopharmaceutique	Immuno-stimulants, Antitumoraux, Anticoagulants, Bactériostatiques, Libérations contrôlées (Gogev, 2003).
Cosmétique	Crèmes, Traitement de l'acné, Produits hydratants, Formulation de dentifrices Formulation de shampooings, crèmes hydratantes et amincissantes, antistatiques, émulsifiantes, filmogènes, hydratantes (La Fleur, 2008).
Médecine	Cicatrisantes, immunologiques, antitumorales, hémostatiques et anticoagulantes (Mokrani, 2013).
Traitement d'eaux usées	Polymère écologique, Pouvoirs séquestrant (métaux lourds, colorants etc.) Diminution de la turbidité (Assaad, 2006), Diminution des odeurs, Bactéricides, agents de chélation des cations et des ions métalliques, floculantes, récupération des métaux. Le chitosane est un agent de coagulation- floculation (Mokrani, 2013).

Chapitre II. Matériels et méthodes

Chapitre II

Dans ce chapitre nous aborderons les points suivants :

- Extraction et transformation chimique de la chitine en chitosane, et la caractérisation physico-chimique de ce dernier, telles que son degré de désacétylation et sa solubilité
- Techniques de caractérisation par la spectroscopie infrarouge IRTF
- Cette partie comprend également: étude de l'effet antibactérien et antioxydant du chitosane extrait.

II. Matériels et méthodes

II.1. produits chimiques utilisés

Tableau 2. Produits chimiques utilisés

Produits chimique	Acide chlorhydrique	Hydroxyde de sodium	Peroxyde d'hydrogène	Ethanol	Acétone	Acide acétique	Glycérol
Formule chimique	HCL	NaOH	H ₂ O ₂	C ₂ H ₅ OH	C ₃ H ₆ O	CH ₃ COOH	C ₃ H ₈ O ₃
Masse moléculaire (g/mol)	36,5	40	34,01	46,07	58,08	60,052	92,09382
Densité	1,19	/	1,11	0,7893	0,7845	1,05	1,26
Pureté	37,5	98	30	99,8	99	99,9	99,7

II.2. Principe

Le principe de base consiste à extraire la chitine à partir des carapaces de crevettes par des traitements successifs avec des bases et des acides minéraux. Cette substance, après purification, subissent ensuite l'hydrolyse basique ou déacétylation pour libérer le chitosane.

II.3. Procédé d'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevettes

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

Afin d'extraire la chitine, une masse d'exosquelettes des crevettes d'environ P0=90g, séchés puis broyés à l'aide d'un mortier de laboratoire, sera soumise à un traitement qui repose sur trois étapes essentielles : à savoir l'étape de déminéralisation, puis une étape de déprotéinisation et en dernier une étape de blanchiment .Le procédé d'extraction de la chitine et de désacétylation choisi est celui proposé par (Michael Oduor Odote P, 2005).



Figure 4. Schéma du prétraitement des carapaces de crevettes.

➤ Flow-sheet de la préparation du chitosane

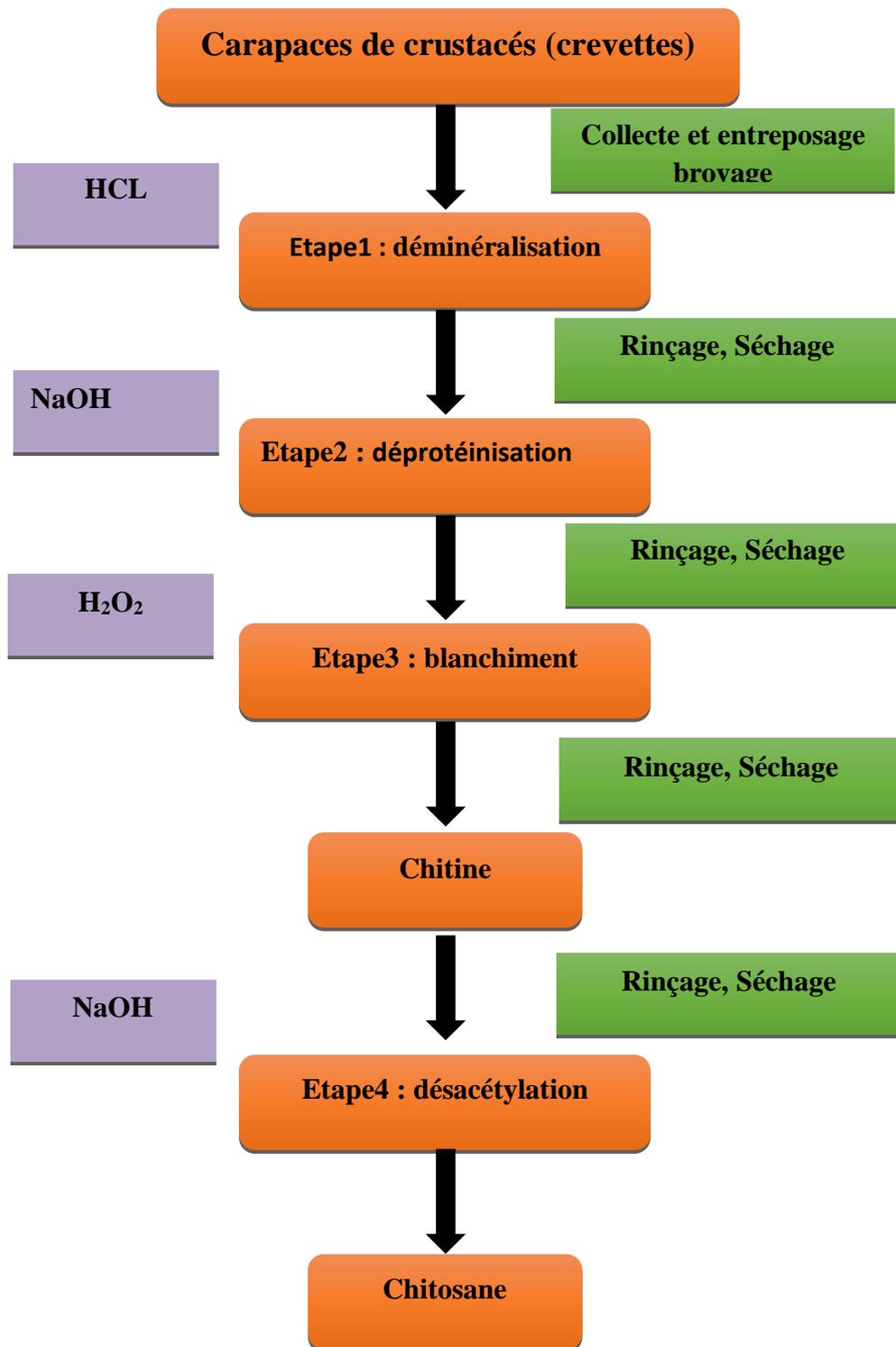


Figure 5. Les étapes de l'extraction de chitosane.

II.3.1. Déminéralisation (décalcification)

- Préparation de la solution acide chlorhydrique à (1 N) :

$$m_{HCL} = C \times V \times M \quad m_{HCL} = 1 \times 1,35 \times 36,5 = 49,275g \dots \dots \dots (1)$$

$$M = 36,46 \text{ g/mol} \quad \text{Pureté} = 37,5 \% \quad \text{Densité } d = 1,19$$

37,5g → 100 g de solution concentré

49,275g → m_{HCL} concentré

$$m_{HCL} = 131,4 \text{ g}$$

$$d = \rho_s / \rho_{eau} \text{ avec } \rho_{eau} = 1 \rightarrow \rho_s = m_s / V = d \times V = m_s / d = 131,4 / 1,19 = 110,42 \text{ ml} \dots \dots \dots (2)$$

Dans un cristallisateur les carapaces, une fois prétraitées (lavage, broyage et séchage), ont été minutieusement mélangées (90g) dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (HCl) (1N) avec une ration (m/v 1/15), le mélange est magnétiquement agité a la température ambiante pendant une nuit, et ce pour dissoudre les minéraux qui accompagnent les carapaces. Le carbonate de calcium (CaCO₃), principal composé minéral de la carapace (entre 30 et 50%), réagit avec le HCl pour former du chlorure de calcium, de l'eau et du gaz carbonique comme décrit dans la réaction (II) :



Finalement le contenu du cristallisateur a été filtré sur une toile filtrante et lavé abandonnement avec de l'eau distillée jusqu'à la neutralité, on sèche la poudre obtenue dans l'étuve à 50°C.

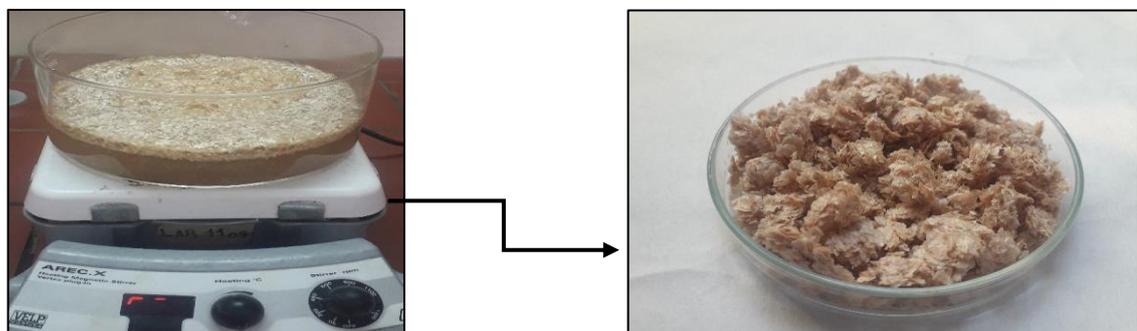


Figure 6. Carapaces de crevettes avant et après la déminéralisation.

II.3.2. Déprotéinisation

- Préparation de la solution d'hydroxyde de sodium à 10 % :

$m_{\text{après la déminéralisation}} = 27,1\text{g}$ avec une portion de (1/20) (m/v) $\longrightarrow V_{\text{total}} = 27,1 \times 20 = 542_{\text{ml}}$

$10\text{g}_{\text{NaOH}} \rightarrow 100_{\text{ml}}$ d'eau distillé

$m_{\text{NaOH}} \rightarrow 542_{\text{ml}}$

$m_{\text{NaOH}} = 54,2\text{g}$

Les carapaces déminéralisées, après des lavages avec de l'eau distillé, ont été mélangées dans des solutions de soude caustique (NaOH) a 10 % en proportion (1/20 m/v) ; (poids de carapace sec/volume (NaOH)). Le mélange est porté à une température de 100°C dans un chauffe-ballon pendant 6h. Ce traitement nous permettra d'éliminer les protéines qui sont présentes avec un taux de 30 à 40% dans les carapaces de crevettes. A la fin du traitement le contenu du cristalliseur est à nouveau filtré sur toile filtrante et rincé abandonnement avec de l'eau distillée jusqu'à la neutralité, l'eau distillée est remplacée par l'acétone. Un ultime rinçage avec de l'eau distillé permet d'entraîner les impuretés lipidiques résiduelles. Le filtrat est alors transféré dans une étuve à 50°C pendant une nuit.



Figure 7. Carapaces de crevettes après la déprotéinisation.

II.3.3. Blanchiment

- Préparation de la solution de peroxyde d'hydrogène à 2,5N :

$$1g \rightarrow 10ml$$

$$22,41 \rightarrow V \quad V = 22,41 \times 10 = 224,1ml$$

$$m = M \times N \times V \rightarrow 34 \times 2,5 \times 224,1 \times 10^{-3} = 19,04g \dots \dots \dots (3)$$

$$m = (19,04 \times 100) / 30 = 63,4g \quad ; \quad V = 63,4 / 1,1 = 57,2ml$$

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

Le blanchiment de la chitine est souvent réalisé par un traitement avec des agents oxydants tel que : le H_2O_2 (2,5N) en masse dans un rapport 1/10 (solide/Liquide ; g/ml) à une température de 30 °C, pendant 3 heures. Le mélange est ensuite filtré et lavé plusieurs fois avec l'eau distillée pour éliminer les composants restants afin d'obtenir un milieu neutre la chitine est ensuite séchée à l'étuve à une température de 35°C pendant 24 heures.



Figure 8. Chitine extraite.

II.3.4. Désacétylation

- Préparation de la solution d'hydroxyde de sodium à 50 % :

$$1g \rightarrow 20ml$$

$$18,5 \rightarrow V \quad V = 18,5 \times 20 = 370ml$$

$$50g_{NaOH} \rightarrow 100ml$$

$M_{\text{NaOH}} \rightarrow 370 \text{ ml}$ $m_{\text{NaOH}} = 370 \times 50 / 100 = 185 \text{ g}$

La désacétylation de la chitine extraite est effectuée avec une solution basique NaOH de forte concentration (40-50%) à une température $\geq 100^\circ\text{C}$.

Dans notre cas, on a choisi de travailler avec le NaOH à 50% avec un ratio 1/20 (m/v), dans lequel le mélange est chauffé à reflux à 120°C pendant 3h. A la fin du traitement le contenu du cristalliseur est filtré et lavé abondamment avec de l'eau distillé jusqu'à la neutralité. Pour accélérer le processus de déshydratation, on rince avec de l'éthanol et on passe à une étuve pendant une nuit à 50°C , puis broyée pour obtenir le chitosane sous forme d'une poudre.



Figure 9. Chitosane extrait.

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

➤ **Le rendement de la réaction**

Pour extraire la chitine à partir des déchets des crevettes, on a utilisé une masse de 90g de poudre sèche, qui a été traitée avec une solution d'acide chlorhydrique (1M) pendant une nuit sous agitation continue, à la température ambiante pour éliminer les composés minéraux (déméralisation) qu'elle contient. Ensuite on a continué l'extraction avec une solution basique d'hydroxyde de sodium à 10% pendant 6h et à une température de 100°C , pour dissocier le complexe chitine-protéines (déprotéinisation).

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

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

Les résultats des rendements obtenus de chaque étape d'extraction ainsi que l'étape de désacétylation sont regroupés dans le tableau (3) :

$$\text{Rendement \%} = \left[\frac{\text{Masse après la réaction}}{\text{masse avant la réaction}} \right] \times 100 \dots \dots (4) \text{ (Jalil R et Nixon J.R, 1990).}$$

Tableau 3. Rendement de la réaction.

Etape	Déminéralisation	Déprotéinisation	Blanchiment	Désacétylation
Rendements	30.11%	82.69%	87.90%	80.25%

Le rendement global : 17.56%

II.4. Caractérisation du chitosane

II.4.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permet d'identifier la présence de groupements chimiques spécifiques.

Cette méthode d'analyse permet rapidement d'obtenir des spectres IR d'échantillons solides et liquides sans nécessiter beaucoup de manipulations au préalable. Le principe repose sur les vibrations entre les atomes et entre différents groupements d'une molécule lorsqu'ils sont excités par une longueur d'onde du spectre infrarouge. L'appareil permet de mesurer ces vibrations et de fournir un spectre caractéristique de la molécule (lorsqu'elle est pure) permettant d'être identifiée et d'être reconnue notamment par l'utilisation de banques de données (Pominville RacetteMathie, 2015).

II.4.1.a. Caractérisation du chitosane par spectroscopie IR-TF

Cette technique simple à mettre en œuvre, est largement utilisée pour étudier la composition et la structure de la chitine, pour distinguer la forme α de la forme β et parfois pour déterminer le degré d'acétylation. Des échantillons de carapaces de crevettes, de la chitine extraite et le chitosane extraits, tous les échantillons ont été broyés en une poudre très fine puis mélangés avec du KBr, le mélange séché a été pressé sous vide dans un moule pour préparer des pastilles de KBr contenant l'échantillon. Un spectrophotomètre infrarouge a été utilisé, les spectres IR des échantillons (de chitine extraite, carapaces de crevettes, et le chitosane extrait) ont été enregistrés dans le mode d'absorption dans la gamme de 400 à 4000 cm^{-1} .



Figure 10. Spectrophotomètre Infrarouge.



Figure 11. Presse hydraulique SHIMADZU .

II.4.2. Détermination du degré de désacétylation

➤ **Par la méthode IRTF**

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

Il est possible par cette méthode de déterminer le degré de désacétylation par la formule suivante ; qui est proposée par (Fernandez Cervera et al., 2004)

$$DD \% = 87.8 - [3 (A_{1655}/A_{3450})] \dots \dots \dots (5).$$

Où : A₁₆₅₅ = absorbance de la bande ‘amide I’ de l’amide secondaire.

A₃₄₅₀ = absorbance de l’hydroxyle du groupement CH₂OH.

87.8 = Coefficient de correction de la ligne de base.

➤ **Par titrage conductimétrique :**

- Préparation de solution de HCL à 0,1N :

$$m = 0,1 \times 36,5 \times 100 \times 10^{-3} = 0,365g \dots \dots \dots (6)$$

$$m' = 0.365 \times 100 / 37,5 = 0.97g$$

$$d = m' / v \qquad V_{HCL} = 0.97 / 1,19 = 0,82ml$$

- Préparation de solution de NaOH à 0,1N :

$$m = 0,1 \times 40 \times 100 \times 10^{-3} = 0,4g \dots \dots \dots (7)$$

Le dosage conductimétrique est une méthode fidèle et juste pour déterminer DD, excepté pour quelques échantillons qui ont un degré de cristallisation élevé (Yu et al., 1999). C'est aussi une méthode simple et peu coûteuse comparée aux autres méthodes d'analyse élémentaire et chromatographique.

La détermination de DD des chitosanes a été effectuée par dosage conductimétrique basique (Yu et al., 1999) qui comporte les étapes suivantes :

- Solubilisation de 150 mg de chitosane dans 10 ml de HCl à 0,1 N
- Ajustement du volume de la solution à 200 ml avec de l'eau distillée

- Titration de la solution de chitosane sous agitation, avec une solution de NaOH à 0,1 N
- Mesure de la conductivité de la solution après chaque ajout de 0,5 ml de NaOH

La formule ci-contre nous permet de calculer le degré de désacétylation :

$$DD : [203 \times (V_2 - V_1) \times N / m + 42 \times (V_2 - V_1) \times N] \times 100 \dots \dots \dots (8).$$

Avec :

- N est la normalité de NaOH
- V₂ et V₁ sont les volumes équivalents en NaOH
- m : la masse de l'échantillon en mg
- 203 : la masse moléculaire du monomère acétylé
- 42 : la différence entre la masse moléculaire du monomère acétylé et du monomère désacétylé

II.4.3. Test de solubilité de la chitosane

Afin d'étudier l'effet de la concentration de l'acide acétique sur la dissolution du chitosane, une série de solutions de 25ml à différentes concentrations de l'acide (0.1, 0.5, 1, 1.5 et 2) mol/l sont préparées, dans lesquelles on dissout une masse de 0.04g du chitosane extrait, sous agitation magnétique pendant 24h à la température ambiante. Les solutions du polymère ont été filtrées sous vide à l'aide d'un papier filtre, ensuite les résidus obtenus seront séchés à l'étuve pendant 24h. Les fractions insolubles seront pesées après séchage, leurs poids (m) permettent de calculer les taux de solubilité avec la formule proposée par (Mohy Eldin et al.,2008) ci-dessous.

$$\text{Taux de solubilité} = [1 - (\text{poids de la fraction insoluble} / \text{poids totale de l'échantillon})] \dots \dots (9).$$

II.4.4. Etude et évaluations des propriétés antibactériennes

Cette partie est consacrée à la présentation des méthodes d'évaluation des propriétés antibactériennes. Ces dernières permettent de mettre en évidence la propriété antibactérienne du chitosane (CHS) extrait sous forme de poudre par la méthode des disques.

II.4.4.1. Etude de l'activité antibactérienne du chitosane extrait

L'activité antibactérienne du chitosane extrait dans cette étude est testée contre quatre types de souches bactériennes pathogènes :(Escherichia coli : gram -), (Staphylococcus Aureus, Candida Albicans, Bacillus cereus : gram +).

- Mettre la gélose de Mueller-Hinton dans un chauffe-bain à 100°C dans le but de la solubiliser.
- Laisser la gélose un peu de temps pour qu'elle refroidisse.
- Stériliser la paillasse, allumer les becs bunsens.
- Prendre 8 boîtes pétri pour chaque bactérie on a fait deux essais, ainsi 4 boîtes pour les témoins.
- Etalement de la gélose sur les boîtes de pétri et attendre presque 15 min pour qu'elle soit sèche.
- Ensemencement des 4 bactéries.
- Mettre trois disques pour chaque boîte.
- Prendre 10µl de l'échantillon ; ensuite le piquer sur les disques.
- Les boîtes de pétri ont ensuite été incubées 37°C pendant 24h.



Figure 12. Etalement de la gélose Mueller-Hinton.



Figure 13. L'état final des boîtes.

II.4.4.2. Capacité de piégeage du 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) radicaux

Le potentiel anti radicalaire d'une substance peut être testé à l'aide d'une méthode colorimétrique en utilisant des radicaux de substitution tel que le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl appelé DPPH.

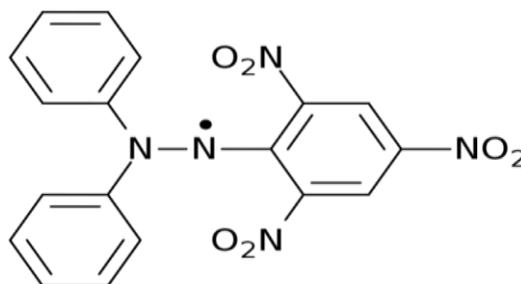
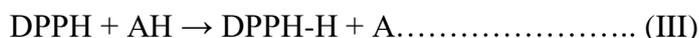


Figure 14. Structure chimique du DPPH.

En solution et à température ambiante, le radical DPPH présente une coloration violette intense. Son passage à la forme non radicalaire, après saturation de ses couches électroniques s'accompagne d'une disparition de cette coloration selon l'équation :



La diminution de l'intensité de la coloration est suivie par mesure colorimétrique à 517 nm. Elle rend ainsi compte du pouvoir piégeur des composés étudiés vis-à-vis du DPPH (Aljawish, 2013). L'effet de piégeage du chitosane sur le radical DPPH sera examiné en utilisant cette méthode décrite par (Shimada et al., 1992) avec quelques modifications.

Chaque échantillon de chitosane (0,1-10mg) préparé dans une solution d'acide acétique à 0,2% sera mélangé avec 1 ml d'une solution méthanolique contenant des radicaux DPPH (on prend en considération l'absorbance de ce mélange doit être comprise entre 0,7 et 0,9 nm) .Le mélange sera agité vigoureusement et laissé au repos pendant 30 minutes dans l'obscurité.

L'absorbance sera ensuite mesurée à 517 nm par rapport à un blanc qui est l'acide acétique pur. Le pourcentage de réduction du DPPH est calculé selon la formule suivante :

$$\% = [(\text{Abs C} - \text{Abs E}) / \text{Abs C}] \times 100 \dots \dots \dots \text{(10)}$$

Abs C : Absorbance de control

Abs E : Absorbance d'échantillon

Chapitre III. Résultats et discussions

Chapitre III

III. Caractérisation du chitosane

III.1. Spectroscopie Infrarouge à Transformation de Fourier (IRTF)

Les spectres infrarouges obtenus des, la chitine extraite, carapaces de crevettes pure ainsi que le chitosane extrait sont représentés sur les figures (14, 15, 16) respectivement. Le spectre infrarouge des carapaces de crevettes (figure 14) montre la présence des pics caractéristiques de la calcite (CaCO_3) à 2517, 1774, 1415, et 877 cm^{-1} , le pic d'absorption à 1541 cm^{-1} est attribué à la région d'absorption des protéines et aussi la présence de la α -chitine a 1651, 1076 et 580 cm^{-1} .

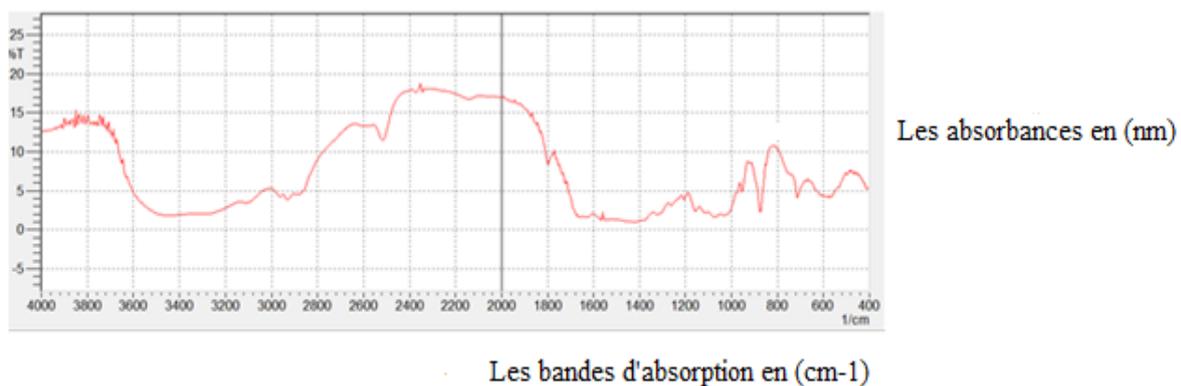


Figure 15. Carapaces de crevettes pures.

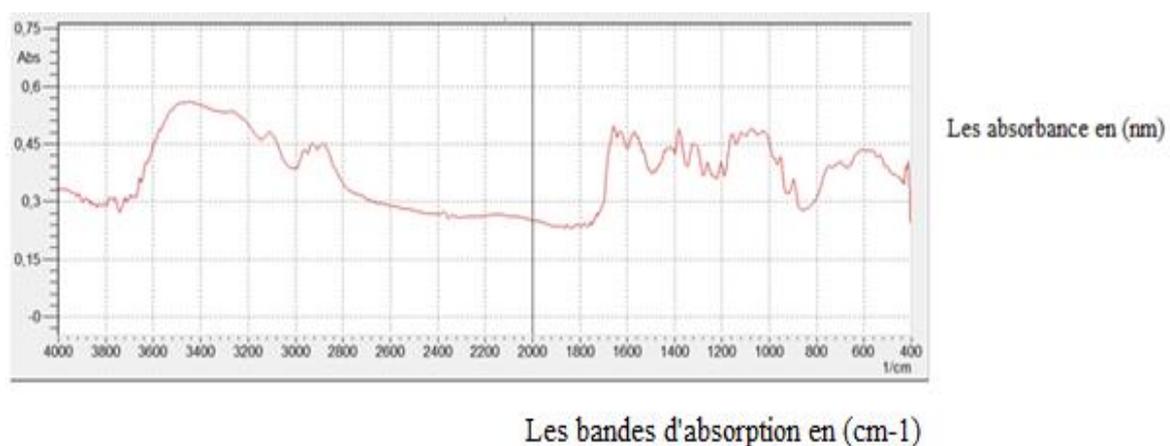


Figure 16. Chitine extraite.

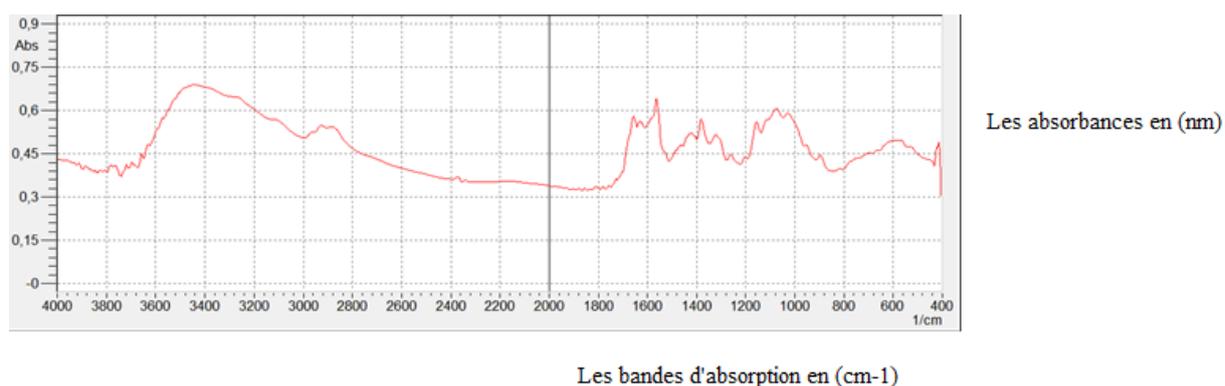


Figure 17. Chitosane extrait.

Le spectre de la chitine extraite est représenté sur la (figure 15). Toutes les bandes observées par l'IRTF de cette dernière sont détaillées dans le tableau(4). D'après le tableau, les pics d'absorption à 1656 et 1631 cm^{-1} sont attribués à la bande amide 1 et à la vibration d'élongation de la liaison $\text{C}=\text{O}$ respectivement, ce qui est typique pour la α -chitine, en revanche dans le cas de la β -chitine un unique pic d'absorption vers 1631 cm^{-1} a été enregistré, aussi la disparition des pics caractéristique de la calcite (CaCO_3) ont été remarqués (2517, 1774 et 877 cm^{-1}).

Les deux spectres montrent une large bande à 3100-3500 cm^{-1} correspondant aux vibrations d'élongation de $-\text{NH}$ et $-\text{OH}$ incluant les liaisons d'hydrogène. L'absorbance de cette bande dans le spectre du chitosane diminue en intensité et se déplace vers une fréquence plus élevée. Ceci est un signe de diminution des liaisons d'hydrogène en raison de l'état amorphe du chitosane.

Tableau 4. Bandes d'absorptions caractéristiques de la chitine extraite

Nombre d'onde (cm-1)	Liaison et types de vibrations
3462	Vibration d'élongation du (O-H...O)(liaison hydrogène intermoléculaire)
3111	Vibration d'élongation du N-H
2962	Vibration d'élongation CH_3 (antisymétrique)
2935	Vibration d'élongation CH_2 (symétrique)

2889	Vibration d'élongation CH
1656 ,1631	Vibration d'élongation C=O(amideI ,bifurcation des liaisons intermoléculaire ponts hydrogène C=O...NH et O-H...O=C)
1568	Vibration d'élongation C-N et de déformation dans CONH(amideII)
1417	Vibration de déformation C-H(antisymétrique)
1384	Recourbement de CH et déformation (symétrique) du CH ₃
1315	Vibration d'élongation du C-N et de déformation du N-H (amideIII),agitation hors du plan du CH ₂
1259	Vibration de déformation du NH(Amide IV)
1155	Vibration d'élongation du C-O-C (liaison oxygène asymétrique)
1070, 1026	Vibration d'élongation de C-OH
950	Agitation hors du plan de CH ₃
898	Recourbement hors plan C-H(cycle glucose, liaison β)
580	Recourbement hors plan C-C

La figure (16) a présenté le spectre FTIR du chitosane extrait où les pics caractéristiques du chitosane ont été observés, et puis elles sont résumées dans le tableau(5). D'après le spectre FTIR du chitosane on remarque des pics d'absorption à 1656 et à 1558 cm⁻¹ qui correspondent respectivement à la bande d'absorption des carbonyles (C=O) dans le groupement NHCOCH₃ (bande amide I) et la bande d'absorption des amines (-NH₂) dans le groupement NHCOCH₃ (bande amide II). La bande à 1375 cm⁻¹ est attribuée à la vibration d'élongation de la liaison C-N (bande amide III), des pics d'absorption à 3444,3417, 2928, 1618 et à 1157 cm⁻¹ sont attribués respectivement à la vibration d'élongation du groupement OH et de la liaison H-N du groupe NH₂, élongation asymétrique de la liaison CH des méthylènes, la déformation des groupements NH₂ et vibration d'élongation symétrique de la liaison -C-O-C-(Liaisons glucosidique).

Tableau 5. Pics caractéristiques enregistrés dans le spectre du chitosane extrait

Nombre d'onde (cm-1)	Liaison et types de vibrations
3444	Vibration d'élongation du (O-H...O) (liaison hydrogène intermoléculaire)
3417	Vibration d'élongation de la liaison N-H du groupe NH ₂
2881	Elongation symétrique de la liaison C-H des méthyles
2928	Elongation symétrique de la liaison C-H des méthylènes
1656	Vibration d'élongation C=O (Amide I)
1618	Déformation angulaire de la liaison N-H des amides
1558	Déformation angulaire de la liaison N-H des amines
1427	Vibration de déformation C-H (antisymétrique)
1375	Vibration d'élongation du C-N et de déformation du N-H (Amide III)
1157	Vibration d'élongation du C-O-C (liaison oxygène symétrique)
1070	Vibration d'élongation de C-OH dans l'acétamide
893	Vibration du squelette circulaire du pyranose

La bande principale qui se trouve à 3462 cm⁻¹ dans le spectre de la chitine se déplace à 3444 cm⁻¹ dans le chitosane. Les absorbances des pics dues aux vibrations d'élongation de -CH et -CH₂ à 2881-2962 cm⁻¹, deviennent plus faibles dans le cas du chitosane. Le spectre de la chitine montre des bandes dans la région 500-900 cm⁻¹ appelée région sensible à la structure. L'absence de ces bandes dans le spectre du chitosane reflète le changement de la structure du polysaccharide (Shaojie *et al.*, 2003).

III.2. Détermination du degré de désacétylation (DD%)

➤ Par la méthode IRTF

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

La détermination du DD ou DA ($DD = 1 - DA$) a été décrite par plusieurs auteurs. Elle est fondée sur la comparaison entre l'absorbance d'une bande qui est proportionnelle à la désacétylation (bande amide I mesurée à 1655cm⁻¹, A₁₆₅₅) et à l'absorbance de la seconde bande qui est indépendante de la désacétylation et qui reste constante, du fait que ce groupement fonctionnel (OH) ne subit pas d'altération chimique lors de l'arrangement du chitosane (bande de référence de OH à 3450 cm⁻¹, A₃₄₅₀) (Mekahlia S, 2007).

Pour notre étude, les bandes en question et caractéristiques des deux fonctions, sont légèrement décalées de 3 cm⁻¹ et 4 cm⁻¹, situées à des fréquences de 1658 et 3446 respectivement. Ces écarts négligeables sont dus aux conditions expérimentales de préparation des échantillons. En utilisant l'équation : $DD \% = 87.8 - [3 \times (A_{1655}/A_{3450})]$ donnée par Fernandez Cervera *et al.*, le DD calculé est de $87.8 - [3 (0,581131/0,689398)] = 85.27\%$.

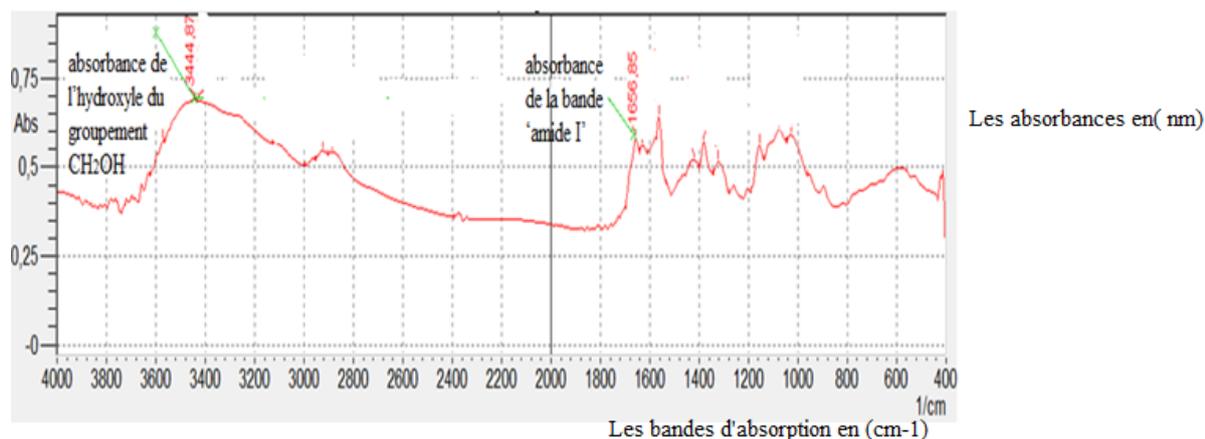


Figure 18. Bande d'amide I et bande de référence d'OH.

➤ Par titrage conductimétrique

Le choix de la conductimétrie basique pour le calcul du DD nécessite une étape préliminaire de la solubilisation de chitosane avec de l'acide chlorhydrique. La mesure de la variation de la conductivité de la solution de chitosane a permis de tracer la courbe présentée dans la (figure 18). Cette courbe démarant de la conductivité initiale correspondante à celle des ions présents dans la solution (H_3O^+ et R-NH_3^+) manifestent trois régions avec apparition de deux points d'inflexion aux volumes V_1 et V_2

- **Région 1 :** on a une diminution rapide de la conductivité jusqu'au volume V_1 , elle est due à la neutralisation des ions H_3O^+ provenant de l'acide chlorhydrique restant (après solubilisation) par la base forte (formation de molécules d'eau).
- **Région 2 :** on remarque un pseudo-équilibre jusqu'au volume V_2 malgré l'ajout de quantités importantes de NaOH. Cette région correspond au passage de la forme ionique NH_3^+ des chitosanes vers la forme neutre NH_2 .
- **Région 3 :** une augmentation rapide de la conductivité grâce à la présence des ions OH^- provenant du NaOH ajouté.

Le calcul du DD, selon cette méthode, se fait selon la formule suivante :

$$\text{DD: } [203. (V_2-V_1).N / m + 42. (V_2-V_1).N].100 \dots \dots \dots (10)$$

Dans cette équation, la différence des volumes de NaOH ($V_2 - V_1$) correspond à la quantité de HCl nécessaire pour dissoudre le chitosane, c'est-à-dire pour transformer les groupements $-NH_2$ en $-NH_3^+$.

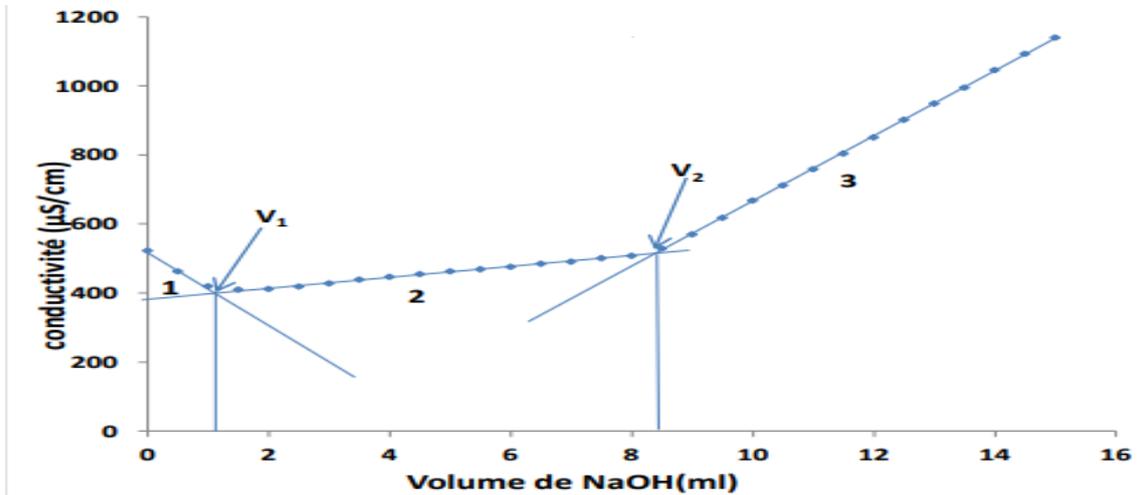


Figure 19. Dosage conductimétrique basique du chitosane.

$$V_1 = 1,1 \text{ ml}$$

$$V_2 = 8,8 \text{ ml}$$

Donc le DD = 85.72% ; une valeur proche de celle déterminée par la méthode IRTF.

III.4. Test de solubilité

L'étude de l'effet de la concentration de l'acide acétique sur la solubilité de chitosane, a été réalisée sur des solutions de l'acide en question à différentes concentrations. La courbe ci-dessous représente le taux de solubilité ce polymère, en fonction des concentrations des solutions d'acide acétique.

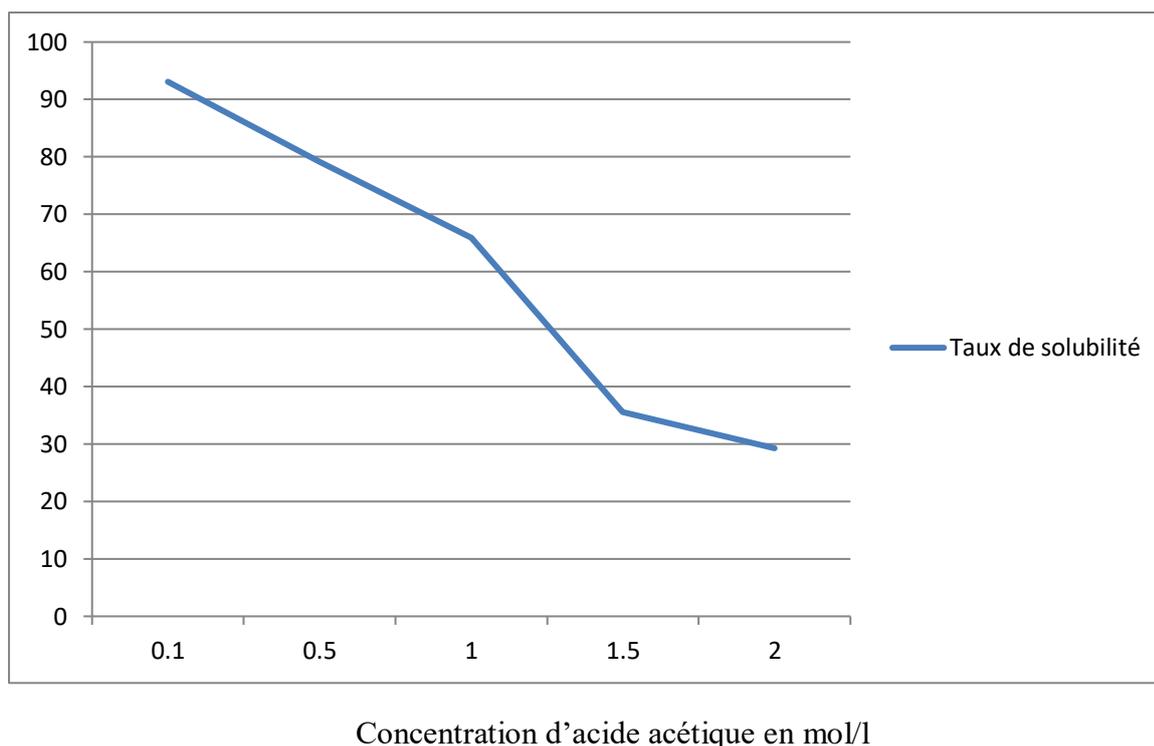


Figure 20. Taux de solubilité en fonction de la concentration d'acide acétique.

La figure (20) montre que le chitosane extrait est soluble à des concentrations d'acides acétiques inférieurs à 1 M. Il atteint de taux de solubilité très élevés de 93,08 % à une concentration de 0,1M. En effet le chitosane est soluble dans les acides dilués, grâce à la protonation de ses groupes amino (-NH₂) libres suivant l'équilibre acido-basique :



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



$$K_a = \frac{[CH_3COO^-] \times [H_3O^+]}{[CH_3COOH]} \dots\dots\dots (VI)$$

Avec K_a : constante de dissociation de l'acide

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

III.5. Activité antioxydante de chitosane

Le test de piégeage des radicaux DPPH est une méthode largement utilisée pour évaluer la capacité d'un antioxydant à piéger les radicaux libres générés par le réactif DPPH. Ce test est

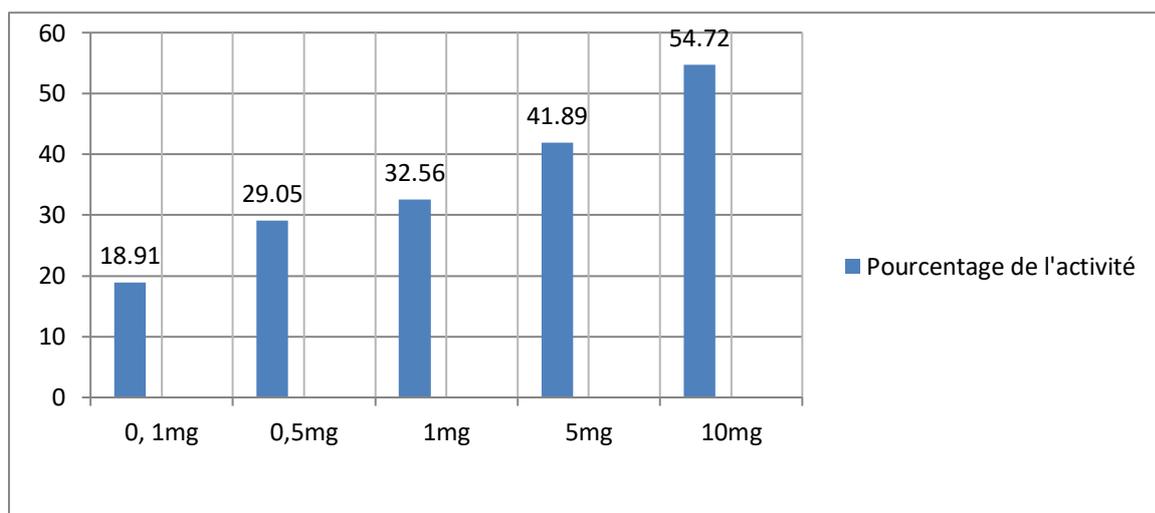
basé sur la capacité de DPPH, un radical libre stable, à tremper et ainsi à se décolorer en présence de antioxydants entraînant une réduction de l'absorbance à 517 nm. (Enayat S et al., 2009).

Le pourcentage de réduction du DPPH est calculé selon la formule suivante :

$$\% = [(Abs\ C - Abs\ E) / Abs\ C] \times 100 \dots \dots \dots (11)$$

Tableau 6. Absorbances des échantillons et pourcentage d’activité antioxydante de chitosane

Echantillon	Absorbances	Pourcentage
DPPH+Méthanol	0,740	
0,1mg	0,600	18,91%
0,5mg	0,525	29,05%
1mg	0,499	32,56%
5mg	0,430	41,89%
10mg	0,335	54,72%



Quantité de chitosane

Figure 21. Histogramme de l’activité antioxydante de chitosane (activité en % en fonction des différentes quantités de chitosane en mg).

Discussion :

Le potentiel de piégeage des radicaux DPPH du chitosane variait de 18,91% à 54,72 % à des concentrations variables allant de 0,1 à 10 mg/ml.

Les activités antioxydantes du chitosane sont régies par la présence de groupes hydroxyle et amino actifs, qui peuvent réagir avec les radicaux libres. (Rajalakshmi et al., 2013), ont démontré que le chitosane extrait de la chitine des carapaces de crevettes, dissous dans l'acide acétique à 0,2%, avait une puissante activité antioxydante.

III.6. Activité antibactérienne

L'effet antimicrobien du chitosane, sur quatre souches microbiennes : E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, B. cereus et C. albicans a été évalué en utilisant la méthode de l'antibiogramme standard par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton (méthode des disques). Les diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les souches bactériennes utilisées dans ce test sont illustrés dans le tableau 7. Cette technique présente l'avantage d'être d'une grande souplesse et de s'appliquer sur un grand nombre d'espèces microbiennes.

Tableau 7. Diamètre d'inhibition en (mm) des souches pathogènes

Les souches pathogènes	Diamètre d'inhibition en (mm)
<i>Escherichia coli</i>	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	8
<i>Bacillus cereus</i>	9,9
candida albicans	7,9



Figure 22. Photos du pouvoir antibactérien du chitosane par la méthode des disques.

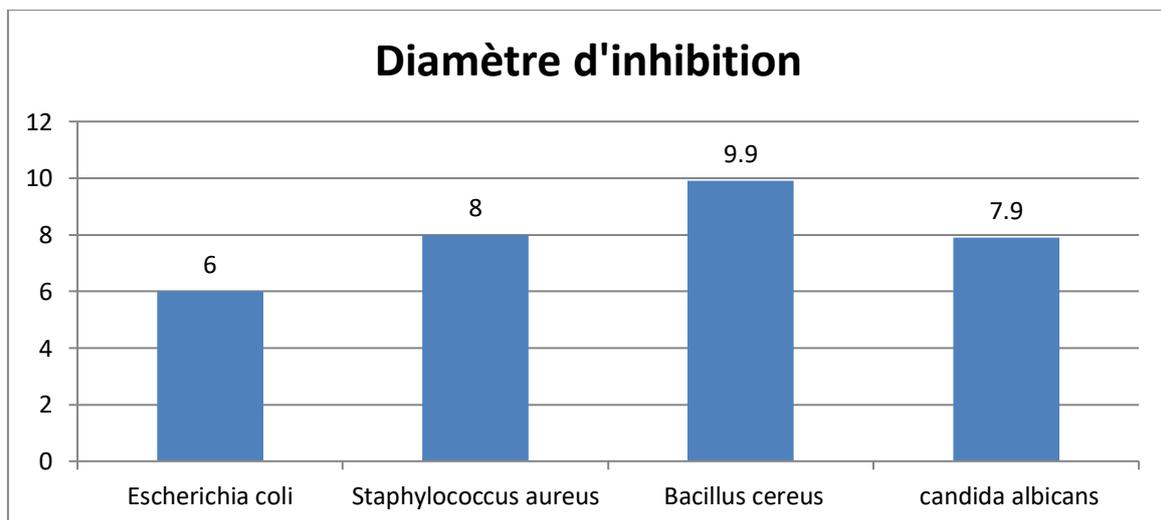


Figure 23. Histogramme de Diamètre d'inhibition en (mm) des souches pathogènes.

Discussion :

Sensibilité des bactéries à Gram positif versus Gram négatif : Bien que la composition des parois cellulaires des bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif soit la même, il existe néanmoins des différences au niveau structural entre ces deux types de bactéries (Figure 24). La paroi cellulaire bactérienne des Gram positif (à droite) est composée de deux couches : une couche épaisse de peptidoglycane ou muréine (10 à 80 nm soit 40 % du poids sec total) recouvrant la membrane plasmique constituée d'une seule bicouche lipidique (V. Coma *et al.*, 2003). D'autre part, la paroi des bactéries à Gram négatif (à gauche) est composée de trois couches : une membrane externe constituée d'une bicouche phospholipidique riche en lipopolysaccharide (LPS) et lipoprotéines, une mince couche de peptidoglycane (entre 2 et 6 nm, soit 10 % du poids sec total) et une membrane plasmique interne, la cible. Habituellement, il est possible de distinguer et de classifier les deux types bactérien en laboratoire en faisant une coloration de Gram suite à laquelle les Gram positif prennent une couleur violacée tandis que les Gram négatif gardent une teinte rosée.

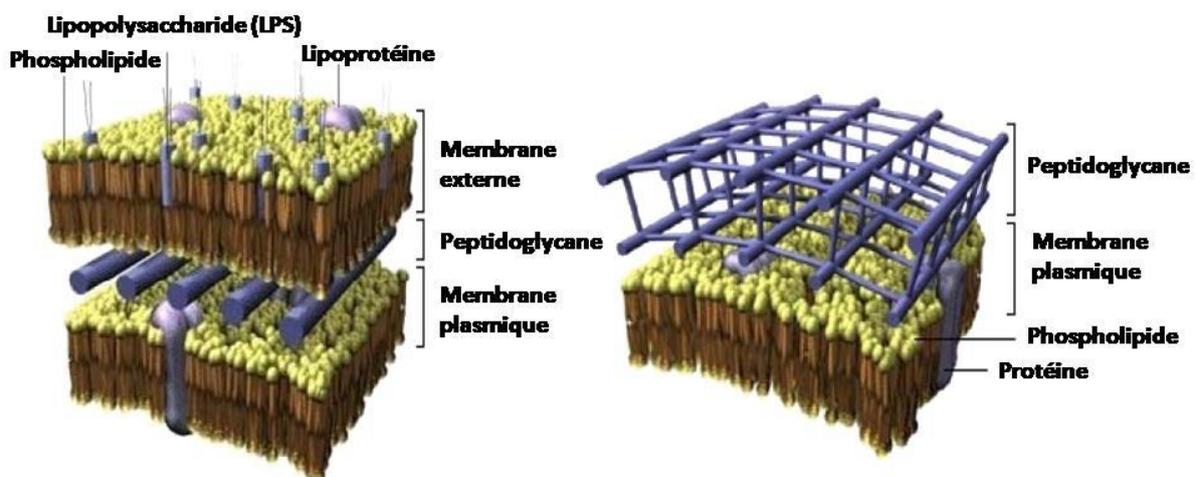


Figure 24. Parois bactérienne des bactéries à Gram négatif (à gauche) et des bactéries à Gram positif (à droite) (E, Drouet).

On a remarqué que les bactéries à Gram positif sont les plus sensibles que les bactéries à Gram négatif (figure23). Ca est due à la complexité moindre de leur paroi (deux couches au lieu de trois) (Zheng L.Y. *et al.*, 2003), (Jeon Y.J *et al.*, 2001)]. Le chitosane pourrait donc facilement se glisser à travers le réseau de peptidoglycane pour atteindre la membrane plasmique. La membrane externe des bactéries à Gram négatif agirait comme une barrière supplémentaire efficace et pourrait freiner et/ou empêcher le chitosane d'atteindre la

membrane cytoplasmique. Donc le chitosane possède une activité antibactérienne plus efficace contre les bactéries à Gram positif, celles-ci étant donc plus sensibles à son action. Inversement, il a été établi que la densité de charge négative sur la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif est supérieure à celle de leurs consœurs Gram positif. De plus, l'hydrophilicité et la polarité des bactéries à Gram négatif sont également significativement plus élevées que celles des bactéries à Gram positif. Cette densité de charge positive et cette hydrophilicité accrues chez les bactéries à Gram négatif sont conférées par la présence de lipopolysaccharides (LPS), dont les bactéries à Gram positif sont dépourvues. Par conséquent, l'affinité, l'interaction et l'adsorption des chaînes de chitosane sur la membrane des bactéries à Gram négatif les rendraient plus sensibles à son action [(Berger L.R.R et al., 2014) ;(Goy R.C. et al., 2009) ;(Chung Y.C et al., 2004)]. Une efficacité qui reste encore mitigée dans la littérature.

Conclusion

Conclusion

Au cours de ce projet de fin d'étude, notre intérêt portait sur la valorisation des carapaces des crevettes. Nos objectifs fondamentaux visés ont été achevés : le premier était la détermination des différentes étapes d'extraction de la chitine et du chitosane à partir des carapaces des crevettes par voie chimique. Le rendement de la chitine atteint 87.90% lors de l'extraction chimique. Le deuxième objectif était la caractérisation de chitosane en calculant son degré de déacétylation par deux méthodes différentes : par la méthode IRTF et par titrage conductimétrique.

On a aussi étudié l'effet de la concentration de l'acide acétique sur la dissolution du chitosane et on a remarqué que le chitosane extrait est soluble à des concentrations d'acides acétiques inférieurs à 1 M. Il atteint des taux de solubilité très élevés de 93,08 % à une concentration de 0,1M.

Le troisième objectif était l'étude de l'activité antibactérienne par la méthode des disques et l'activité antioxydante du chitosane. Concernant la méthode des disques, le chitosane agit sur la plupart des bactéries (*Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Candida Albicans*, *Bacillus cereus*).

Pour déterminer l'activité antioxydante de chitosane, nous avons établi un ensemble de tests en fonction des concentrations croissantes en calculant le pourcentage de l'activité. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que le chitosane a une activité antioxydante.

L'ensemble de ces résultats montre l'intérêt du chitosane, celui-ci présente un pouvoir antimicrobien, et antioxydant assez intéressant. A cet effet nous préconisons d'extraire ; de caractériser et d'exploiter les propriétés du chitosane des déchets de crevette, en tant que polymère doté de propriétés antimicrobiennes et antioxydantes.

Références bibliographiques

A

Abdallah M.R.S et al., déc 2017 : « Improving the sensory, physicochemical and microbiological quality of pastirma (A traditional dry cured meat product) using chitosan coating », LWT, vol. 86.

Aider M , « Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review », LWT - Food Sci. Technol., vol. 43, no 6,juill. 2010.

Akiyama M et al., (2003): «Environmental life cycle comparison of poly hydroxy alkanooates produced from renewable carbonre sources by bacterial fermentation. Polym. Degrad. Stab».

Aljawish A, (2013) : « Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères » Thèse de doctorat de l'université de Lorraine.

Arbia L, (2010) : «Contribution à l'étude de la déminéralisation et la déprotéinisation de la carapace de crabe de la crevette par voie fermentaire», mémoire de magister, ENP.

ARCHER M, (2007) : «Crustacea processing waste management. SEAFISH Research and Development, United Kingdom».

Assaad E, (2006) :«Etude du processus de coagulation-floculation du système montmorillonite-chitosane dans l'élimination de métaux de transition», mémoire de master, Université du Quebec.

B

Berger L.R.R et al., «Green Conversion of Agroindustrial Wastes into Chitin and Chitosan by Rhizo pusarrhizus and Cuning hamella elegans Strains» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15,2014.

Briston J.H et al., «Plastics in Contact with Food; Food Trade Press»: London, U.K.; Chapters 4 and 5;1974.

C

Chaves-Lopez C.C et al., « Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungi involve in fruit decay and mechanisms of action », Trends Food Sci. Technol., vol. 78,août 2018.

Chien P et al., (2006): «Antifungal activity of chitosan and its application to control postharvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (Citrus tankan hayata) », *Journal of the Science of Food and Agriculture* (86) .

Coma V et al., : «Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan Polymer—Antimicrobial Activity Assessment on Dairy;Related Contaminants», *Journal of Food Science*, vol. 68, 2003.

Chung Y.C et al., : «Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall,» *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 25,2004.

Chen M.C et al., (1996): «Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative». *J. Food Proc Preserv*20 (5).

Chatfield H. W : «Varnish Constituents; Leonard Hill»: London,U.K,1953.

Crini G et al., (2009) : «Chitine et chitosane du biopolymère à l'application», Presses universitaires de Franche- Comté.

Crini G, (2006): «Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresource Technology*».

Cuero R.G, (1999) : «Antimicrobial action of exogenous chitosan»,*EXS* (87) .

D

Divya K.V et al., : « Antifungal, antioxidant and cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and its use as an edible coating on vegetables », *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 114, juill 2018.

Doelker E : « Cinétique et mécanismes de la libération contrôlée à partir des systèmes polymériques, dans: *Formes pharmaceutiques nouvelles: Aspects technologique, biopharmaceutique et médical. Technique et Documentation* (Lavoisier) », Paris.

Durand V et al., (2010) : « Le chitosane-un biopolymère d'avenir pour les papiers antimicrobiens ; Cas des emballages alimentaires», CERIG, Grenoble Pagora INP.

Duikom Noutsu et al., (2012) : «Valorisation des fractions de la production d'éthanol de maïs en bioplastique » *Mémoire de maîtrise électronique*, Montréal, Ecole de technologie supérieure.

E

Eaton P et al., (2008): «Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*., *Ultramicroscopy*» (108).

El Hadji Babacar : «Nouveaux matériaux composites thermoformables à base de fibres de cellulose, thèse de doctorat», (2008).

Enayat S et al., 2009: Leaves, bark and catkins of *Salix aegyptiaca* L. were extracted into solvents of increasing polarity from cyclohexane (non-polar), butanol, ethanol and water (polar) and analysed for their antioxidant capacity, total phenol and flavonoids.

F

Ferry J.D : «Concentrated Solutions, Plasticized Polymers, and Gels. In: Viscoelastic Properties of Polymers», 3rd ed.; Wiley: New York .

Fernandez C.M et al., : «Solid-state characterization of chitosan derived from lobster chitin». *Carbohydrate Polymers* 58,2004.

G

Gogev et al., (2003) : « Les chitosanes-nouveaux adjuvants pour la vaccination par voie muqueuse chez les animaux », Article de synthèse, Université de Liège.

Goy R.C et al., : «A review of the antimicrobial activity of chitosan», *Polímeros*, vol. 19,2009.

H

Hadley D.W et al., : «An Introduction to the Mechanical Properties of Solid Polymers» Wiley: New York, 1993.

J

Jalil R and Nixon J.R: «Biodegradable poly (lactic acid) and poly (lactide-co-glycolide) microcapsules : problems associated with preparative techniques and release properties». *Journal Microencapsulation* 7 (3), 1990.

Jeon Y.J et al., : «Antimicrobial effect of chito-oligo saccharides produced by bioreactor, » *Carbohydrate polymers*, vol. 44, 2001.

Jumaa M et al., (2002): «A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (53) » .

Juneja et al., (2006): *J. Food Sci* 71.M236.

K

Kannuchamy N et al., :« Functionality of chitosan in batter formulations for coating of fish sticks: Effect on physicochemical quality », *Carbohydr. Polym.*, vol. 169, août 2017.

Kendra D.F et al., (1984): «Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solanjan* elicits pisatin formation in *pisumsativum*».

Kong M et al., (2010): «Antimicrobial properties of chitosan and mode of action»: A state of the art review.,*International Journal of Food Microbiology* (144).

L

Lafleur C, (2008): «Evaluation d'un procédé de coagulation-floculation au chitosane pour l'enlèvement du phosphore dans les effluents piscicoles», Ecole de technologie supérieure, Université du Québec, SODIM.

Le Devedec F, (2008) : «Séparation des oligomères du chitosane par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés», mémoire de master, Université du Québec à Montréal.

Lee S.H et al., : «Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights» *International Journal of Food Microbiology*, vol. 74, 2002.

Le Roux K, (2012) : «Purification de chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevettes *Penaeus Vannamei*. Caractérisation des produits et optimisation du procédé», thèse de doctorat, Université de Nantes.

M

Marie-Beatrice G, (1998) : «Etude de la performance du chitosane comme coagulant pour enlèvement du cuivre et de la turbidité des eaux usées» Université de MONTREAL.

Maciel L.C et al., :« Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges », *Food Res. Int.*, vol. 107, mai 2018.

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

Mignotte O et al., (2012) : «Dépolluer une eau avec des carapaces de crevettes ? Pas si complexe...», article, vol 106, Union des professeurs de physique et de chimie.

Michael Oduor Odote P et al., : «Characterisation of Chitosan from Blowfly Larvae and Some Crustacean Species from Kenyan Marine Waters Prepared Under Different Conditions». *Western Indian Ocean J. Mar. Sci.* Vol. 4, No. 1; 2005.

Monette F et al., (2007) : «Valorisation des résidus industriels de pêches pour la transformation de chitosane par technique hydrothermo-chimique», Université du Québec.

Mourad F, (2012): « Co-adsorption des métaux lourds sur la bentonite modifiée en présence de flocculants minéral et biologique», mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri Tiouzou..

Mohy Eldin M.S et al., : «Antibacterial Activity of Chitosan Chemically Modified with New Technique». Trends Biomater. Artif. Organs Vol 22(3),2008.

Mokrani N, (2013):«Préparation et étude du comportement de membranes biopolymères», mémoire de magister, Université M'hamedBougara-Boumerdes, Algérie.

P

Pascal G, (1979) : «Les antioxygènes alimentaires.,*Cahier de Nutrition et de Diététique*» (14).

Pérez-Mateos M, (2007) :«Les applications alimentaires du chitosane et dérivés». InstitutodelFrío (CSIC), José Antonio Novais, 10, E28040 Madrid, Spain.

Pominville-Racette Mathie. (2015).«La transformation de carapaces de crevettes en chitosane»Rapport intermédiaire-groupe A. Université de Sherbrooke.

Q

Qin Y et al., (2006): «The absorption and release of silver and zinc ions by chitosan fibers»,*J ApplPolymSci*(101).

Quijada-Garrido et al., (2006):«Srinivasa, Ramesh, &Tharanathan, 2007; Suyatma, Tighzert, Copinet, & Coma, 2005) ».

R

Rabea E.I et al., (2003): «Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action.,*Biomacromolecules*(4) ».

Rajalakshmi et al., 2013 : « Antioxidant Activity of the Chitosan Extracted from Shrimp Exoskeleton», Article in Middle East Journal of Scientific Research 16(10) .

Randrianasolo , (2003) : « Contribution aux études sur la préparation du chitosane à partir des carapaces de crevettes», mémoire d'ingénieur, ESPA.

Rodríguez M.S et al., (2003): «Antimicrobial Action of Chitosan against Spoilage Organisms in Precooked Pizza»,*J Food Sci*68 (1).

Roos Y.H : «Food Components and Polymers. In Phase Transition sin Foods»Academic Press: San Diego, CA ,1995.

Roller S et al., : « The Antimicrobial Properties of Chitosan in Mayonnaise and Mayonnaise-Based Shrimp Salads », *J. Food Prot.*, vol. 63, no 2, févr.2000.

Rao M.S et al., (2008): «Synergistic effect of chitooligosaccharides and lysozyme for meat preservation»,*LWT-Food Sci. Technol*(41) : 1995-2001.

S

Sagoo S et al., (2002): «Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled pork products». *Food Microbiol*(19) .

Savard T et al., (2002): «Antimicrobial action of hydrolyzed chitosan against spoilage yeasts and lactic acid bacteria of fermented vegetables.*J. Food». Protect* (65).

Sekiguchi S et al., (2002): «Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-Isozymeconjugates»,*Food Research International* (35).

Shahidi F et al., (1999) : «Foud application of chitin and chitosan», *Trends in foud science and Technology*(10) .

Shaojie L et al., 2003 «Preparation of water-soluble chitosan». *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 91, no. 6.

Shimada K et al., (1992): «Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (40).

Stossel Pet al., (1984): « Effect of chitosan, chitin and someamino sugars on growth of various soilborne phytopathogenic fungi.,*Journal of Phytopathology Phytopathologische Zeitschrift*(111) ».

Sudharshan N.R et al., (1992): «Antibacterial action of chitosan»,*Food Biotechnology* (6) .

T

Tual E et al.,: « Transport properties of chitosan membranes: Influence of crosslinking », *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 38, no 11.

V

Valentina Siracusa et al., : «Biodegradable polymers for food packaging: a review, *Trends in Food Science & Technology*», 19,2008.

Z

Zakrzewska A et al., (2005): «Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan», *Eukaryot. Cell* (4).

Zemmouri H, (2008) : «Le chitosane ...est-il la molécule du siècle».

Zheng L.Y et al., (2003): «Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights», *Carbohydr Polymer* (54) .

Zivanovic S et al., (2004): «Molecular weight of chitosan influences antimicrobial activity in oil-in-water emulsions», *J. Food. Prot*(67).

Résumé

Le chitosane est préparé à partir de chitine, il est principalement composé de résidus de glucosamine et de N-acétylglucosamine avec une liaison 1,4- β . Il peut être obtenu par désacétylation de la chitine produite à partir de carapaces de crustacés, d'insectes et d'autres sources. Le chitosane est un polymère naturel non toxique, biodégradable et biocompatible et peut être utilisé dans de nombreuses applications, comme la biomédecine, pharmaceutique, la cosmétique, etc. Dans notre étude, nous intéressons au premier lieu à l'extraction de la chitine à partir de la carapace de la crevette, ainsi qu'à sa conversion en chitosane, par des différentes méthodes d'extraction. Nous avons étudié aussi le comportement antibactérien par la méthode des disques, Les résultats obtenus révèlent un effet antimicrobien important démontré par un diamètre d'inhibition au niveau de plusieurs souches bactériennes. Un ensemble de tests ont été aussi effectués dans le contexte de la détermination du pouvoir antioxydant du chitosane et les résultats obtenus ont prouvé l'efficacité du chitosane contre les germes pathogènes.

Mot clé : Crevette, Chitine, Chitosane, extraction, pouvoir antimicrobien, antioxydant.

Abstact

Chitosan is prepared from chitin, it is mainly composed of residues of glucosamine and N-acetylglucosamine with 1,4- β bond. It can be obtained by deacetylating chitin produced from the shells of crustaceans, insects and other sources. Chitosan is a non-toxic, biodegradable and biocompatible natural polymer and can be used in many applications, such as biomedicine, pharmaceutical, cosmetics, etc. In our study, we are primarily interested in the extraction of chitin from the shrimp shell, as well as its conversion into chitosan, by different extraction methods. We also studied the antibacterial behavior by the disc method. The results obtained reveal a significant antimicrobial effect demonstrated by an inhibition diameter at the level of several bacterial strains. A set of tests was also developed in the context of determining the antioxidant power of chitosan and the results obtained proved the effectiveness of chitosan against pathogenic germs.

Keyword: Red shrimp, Chitin, Chitosan, extraction, antimicrobial, antioxidant.

