

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



Université A.MIRA-BEJAIA  
Faculté de Technologie  
Département Génie des Procèdes



## Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme Master en Génie des Procédés

Spécialité : Génie Alimentaire

**Thème :**

**Étude des propriétés des composites à base de chitosane et de PLA  
en vue d'une application dans les emballages alimentaires**

**Présenté par :**

M<sup>elle</sup> MEKREZ Sonia

M<sup>elle</sup> MOHAMEDI Kenza

**Composition de jury :**

Mme W. BELKHIRI-BEDER	MAB	Présidente
Mr S.FATMI	MAC	Examineur
Mme N.CHIBANI	MCB	Promoteur

*Année Universitaire : 2019/2020*



## **Remerciement**

### **REMERCIEMENT**

Notre profonde et sincère gratitude est adressée à notre encadrant madame CHIBANI, 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 HAMADACHE pour ces conseils.

Nos vifs remerciements au président et aux membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'évaluer ce travail.

## DEDICACE

---

Je dédie ce travail

A

Mes chers parents ;

Mon très cher et unique frère AMINE, mes cher cousins (Nordine, Farouk, Farid, Rachid) et cousines (Lila, Yasmine , Sarah) ;

Mes deux grands-mères, et à la mémoire de mon grand père ;

Mon mari pour sa présence à mes cotés ;

Ma chère binôme et ma très chère amie Kenza pour tous les bons moments et délires qu'on a vécu ensemble durant ces 4 dernières années.

Ma copine et ma sœur de cœur Sarah ;

SONIA

## DEDICACE

---

Je dédie ce travail

A

Mes chers parents, mes frères (Hamza, Malek et Mehenni), mes cousines (Lynda, Sara, Tiziri, Tilelli) et à tous mes amis ;

Mes grands parents et à la mémoire de ma chère tante et ma grand-mère ;

Ma binôme et ma chère amie Sonia que je remercie d'ailleurs pour tous ce qu'on a vécu ensemble.

KENZA

## DEDICACE

---

## Symboles & Abréviations

---

**PHA** : Polyhydroxyalkanoate

**PLA** : Acide poly lactique

**PCL** : Polycaprolactone

**PEG** : Polyéthylène Glycol

**DD** : Degré désacétylation

**DA** : Degré d'acétylation

**DM** : Degré de déminéralisation

**DProt** : Degré déproteinisation

**T<sub>H</sub> %** : Teneur en humidité

**T<sub>C</sub> %** : Teneur en cendres

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**PVE** : Perméabilité à la vapeur d'eau

**TRVE** : Vitesse de transmission de la vapeur d'eau

**M/V** : Masse/Volume

**CHS** : Chitosane

**Gly** : Glycérol

**CHS/ACac** : Chitosane/ Acide Acétique

**CHS/ACLac** : Chitosane/ Acide Lactique

**CHS/Gly/ACac** : Chitosane/ Glycérol/ Acide Acétique

**CHS/Gly/ACLac** : Chitosane/ Glycérol/ Acide Lactique

**N** : Normale

**M** : Molarité

## Liste des Figures

---

<b>Figure I.1 :</b> Classification des polymères biodégradables.....	4
<b>Figure I.2 :</b> Structure moléculaire du PLA.....	8
<b>Figure I.3:</b> Structure chimique de la chitine et du chitosane.....	11
<b>Figure I.4:</b> Obtention du chitosane par désacétylation de la chitine.....	11
<b>Figure I.5 :</b> Les liaisons hydrogènes en pointillés dans la structure de la chitine..	12
<b>Figure I.6 :</b> Arrangement des trois formes existantes de chitine : , et .....	13
<b>Figure I.7 :</b> des exemples d'objets de chitosane moulés, colorés avec des colorants hydrosolubles.....	18
<b>Figure I.8 :</b> Engrais, pesticides et fongicides d'oligosaccharides chitosane sous forme liquide organique naturel produits par Qingdao Jingling Ocean Technology.....	19
<b>Figure I.9:</b> différents types de pansements à base de chitine/chitosane produits par Shandong Cheerain Medical.....	20
<b>Figure I.10 :</b> Procédé industriel de fabrication de la chitine et de ses dérivés.....	21
<b>Figure II.1:</b> Type de crevettes utilisés ((à droite) <i>Aristeus antennatus</i> et <i>Parapenaeus longirostris</i> (à gauche)) et les carapaces récupérés.....	25
<b>Figure II.2 :</b> fragments des carapaces des crevettes obtenus après le prétraitement.	25
<b>Figure II.3 :</b> Chitine extraite.....	26
<b>Figure II.4. :</b> Poudre de chitosane.....	27
<b>Figure II.5 :</b> Préparation des souches bactériennes par dilution successive.....	34
<b>Figure II.6 :</b> Exemple d'un test d'activité antibactérienne par diffusion en gélose.....	35
<b>Figure II.7:</b> Spectres infrarouges des carapaces des crevettes non traitées (a) ; chitine extraite (b) ; chitine commerciale (c).....	38
<b>Figure II.8 :</b> Spectres infrarouge des échantillons chitine extraite et de chitosane commerciale superposée.....	39
<b>Figure II.9 :</b> Spectres infrarouge du chitosane extrait (a) et commercial (b).....	40
<b>Figure II.10 :</b> Spectre FTIR de PLA, CHS, PLA /CHS 95/5%, PLA/CHS 90/10%..	42
<b>Figure II.11 :</b> Spectres IR-TF du film avec 63% de CHS, 18% PLA et 9% PEG (1) et des polymères purs le composant : (2) CHS, (3) PLA, (5) PEG.....	42
<b>Figure II.12 :</b> Test de solubilité de la chitine extraite dans l'acide acétique 0.17M (après 24h).....	43
<b>Figure II.13 :</b> Test de solubilité du chitosane extrait dans l'acide acétique 0.17M (après 10m).....	43



## Liste des Figures

---

<b>Figure II.14</b> : Perméabilité à la vapeur d'eau en fonction du % de PLA.....	44
<b>Figure II.15</b> : Evolution de la masse des gobelets de test couvert par des films de PLA, PLA/CHS 95/5%, PLA/CHS 90/10 %.....	45
<b>Figure II.16</b> : Test de dilution en milieu solide des CMI de chitosane contre (a) Escherichia Coli, (b) Staphylococcus aureus, (c) Listeria monocytogenes et (d) Salmonella typhimurium.....	47

## Liste de tableaux

---

<b>Tableau I.1 :</b> Teneur en chitine par espèces.....	14
<b>Tableau II.1 :</b> Produits chimiques et appareils utilisés.....	24
<b>Tableau II.2 :</b> Composition massique (en % massique) des films préparés en solution...	27
<b>Tableau II.3 :</b> Composition massique en % et nomenclatures des échantillons non-plastifiés et plastifiés.....	28
<b>Tableau II.4 :</b> Teneur en eau des différents échantillons préparés.....	29
<b>Tableau II.5 :</b> Teneurs en eau et teneur en cendre de la chitine et du chitosane extraits...	36
<b>Tableau II.6 :</b> Les bandes d'absorptions caractéristiques de la chitine extraite.....	37
<b>Tableau II.7:</b> Pics caractéristiques enregistrés dans le spectre du chitosane extrait ..	40
<b>Tableau II.8:</b> Degrés de déacétylation (DD%) des échantillons de chitine et de chitosane (extraits et commerciaux).....	41
<b>Tableau II.9 :</b> Transmission de la vapeur d'eau (TRVE), Perméabilité à la Vapeur d'eau (PVE) du PLA vierge, mélange PLA/ CHS.....	45
<b>Tableau II.10:</b> Concentration minimale inhibitrice (CMI) en (%) du chitosane extrait contre quatre bactéries différentes.....	47

## Table de matières

### Symboles & Abréviations

### Liste de figures

### Liste de tableau

## Introduction générale..... 1

## Chapitre I : Etude bibliographique

### PARTIE 1 : Généralités sur les polymères biodégradables et poly (acide lactique)

#### I.1. Bioplastiques alternatives aux plastiques pétrochimiques..... 3

##### I.1.1. introduction..... 3

##### I.1.2. Classification des polymères biodégradables..... 3

##### I.1.3. Propriétés des biopolymères..... 4

###### I.1.3.1. Biodégradabilité..... 4

###### I.1.3.2. Perméabilité à la vapeur d'eau..... 5

###### I.1.3.3. Biocompatibilité et biorésorbabilité..... 6

###### I.1.3.4. Propriétés chimiques..... 6

##### I.1.4. Facteurs qui influencent la biodégradation..... 7

###### I.1.4.1. Les paramètres physico-chimiques du milieu de dégradation..... 7

###### I.1.4.2. Les paramètres microbiologiques du milieu de dégradation..... 7

###### I.1.4.3. La structure et les propriétés des polymères constituant le matériau..... 7

###### I.1.4.4. Le procédé de fabrication du matériau..... 7

##### I.1.5. Cas particulier du poly acide lactique (PLA) ..... 8

###### I.1.5.1. Propriétés du PLA ..... 8

###### I.1.5.2. Applications ..... 9

###### I.1.5.2.a. Applications médicales et pharmaceutiques ..... 9

###### I.1.5.2.b. Applications comme films/emballages ..... 9

### PARTIE 2 : LA CHITINE ET LE CHITOSANE

#### I.2.1. Généralités..... 10

##### I.2.1.1. Historique..... 10

I.2.1.2. La Chitine et le Chitosane.....	10
I.2.1.3. Structure physique de la chitine.....	12
I.2.1.4. Structure physique du chitosane.....	13
I.2.1.5. Disponibilité de la chitine .....	14
I.2.2. Propriétés physico-chimique.....	14
I.2.2.1. Degré de désacétylation (DD) ou le degré d'acétylation (DA).....	14
I.2.2.2. La cristallinité.....	15
I.2.2.3. Solubilité .....	15
I.2.2.4. Viscosité.....	16
I.2.3. Propriétés biologiques.....	16
I.2.4. Application.....	17
I.2.4.1. Agroalimentaire.....	17
I.2.4.2. Emballage antimicrobien.....	18
I.2.4.3. Traitement des eaux .....	18
I.2.4.5. Agriculture.....	19
I.2.4.6. Pharmaceutique.....	19
I.2.4.7. Cosmétique.....	20
I.2.5. La production de la chitine et de ses dérivés par voie chimique.....	20
I.2.5.1. La déminéralisation.....	21
I.2.5.2. La déprotéinisation .....	22
I.2.5.3. La décoloration.....	22
I.2.5.4. Désacétylation de la chitine.....	23

## **Chapitre II: RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **PARTIE 1 : MATERIAUX ET METHODES EXPERIMENTALES**

II.1. Matériaux et méthodes expérimentales.....	24
II.1.1. Matériaux et produits.....	24
II.1.2. Méthodes expérimentales.....	25
II.1.2.1. Extraction de la chitine et du chitosane.....	25

II.1.2.1.a. Prétraitement des carapaces de crevettes récupérées.....	25
II.1.2.1.b. Extraction de la chitine .....	26
II.1.2.1.c. Déacétylation de Chitine et obtention du Chitosane .....	27
II.1.2.2. Prétraitement du mélange PLA/chitosane .....	27
II.1.2.3. Plastification du chitosane .....	28
II.1.3. Techniques de caractérisations .....	29
II.1.3.1. Teneurs en eau et en cendres .....	29
II.1.3.2. Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (FTIR) .....	30
II.1.3.2.a. Caractérisation du chitosane par spectroscopie IR-TF.....	30
II.1.3.2.b. Caractérisation des films par spectroscopie IR-TF.....	31
II.1.3.3. Test de solubilité de la chitine et du chitosane	31
II.1.3.4. la perméabilité à la vapeur d'eau .....	31
II.1.4. Etude et évaluations des propriétés antibactériennes .....	32
II.1.4.1. Etude de l'activité antibactérienne du chitosane extrait et des films PLA pur, Chitosane pur et PLA/CHS .....	32
II.1.4.2. La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la méthode de dilution en liquide et en solide.....	33
<b>PARTIE 2 : RESULTATS ET DISCUSSIONS</b>	
II.2. Résultats et discussions.....	36
II.2.1.Teneur en eau et en cendres .....	36
II.2.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformation de Fourier (IRTF) .....	36
II.2.2.1. Caractérisation de la chitine et du chitosane extraits.....	36
II.2.2.2. caractérisation des mélanges PLA/CHS extrait.....	41
II.2.3.Test de Solubilité .....	43
II.2.3. Perméabilité a la vapeur d'eau (PVE) et vitesse de transmission de la vapeur d'eau (TRVE) .....	43
II.2.4. Etude des propriétés antibactériennes du chitosane extrait .....	46
II.2.4.1.Etude des propriétés antibactériennes des films à base de PLA chargés de chitosane.....	



## Introduction générale :

Dans le secteur de l'emballage, l'un des premiers secteurs demandeur en plastique [1][2], l'emballage alimentaire est celui qui présente la croissance la plus élevée[3]. C'est de là que découle notre intérêt pour le développement d'un nouvel emballage alimentaire biodégradable. Ce dernier a été synthétisé à partir des deux polymères, l'acide polylactique (PLA) et le chitosane (CHS), vu leur disponibilité, leurs coûts, leur biodégradabilité et surtout leurs propriétés complémentaires.

Le PLA est un biopolyester synthétique, linéaire et aliphatique. Son principal avantage est qu'il est obtenu à partir des ressources renouvelables, 100 % riches en amidon tel que : Le maïs, la betterave ou la pomme de terre [4]. De plus, il est non toxique, biodégradable et présente des propriétés mécaniques très intéressantes comparables à celles des polymères classiques. Il peut également être synthétisé soit par polymérisation par condensation d'acide lactique ou par polymérisation par ouverture de cycle du lactide en présence d'un catalyseur [5].

Le chitosane est un polymère naturel, non toxique, comestible et biodégradable, dérivé de la désacétylation de la chitine, qui est le deuxième biopolymère le plus abondant dans la nature après la cellulose [6]. En général, la chitine se présente dans l'exosquelette des arthropodes tels que les insectes, les crabes, les crevettes, les homards et certaines parois cellulaires fongiques [7]. Il possède un potentiel en tant que polymère d'emballage et, plus particulièrement, en tant que emballage ou revêtement comestible en raison de sa capacité à former un film sans aucune utilisation d'additifs [8]. De plus, le film de chitosane a une bonne perméabilité à l'oxygène et au dioxyde de carbone, qui est inférieure à celle du film de polyéthylène [9][10], et de bonnes propriétés mécaniques, qui sont comparables à ceux de nombreux polymères commerciaux de force moyenne [10]. En outre, le chitosane a montré des activités antimicrobiennes contre les bactéries [11], les champignons [12] et les levures [13]. Par conséquent, le chitosane a été utilisé dans des emballages ou des films comestibles pour prolonger la durée de conservation des denrées alimentaires ; par exemple, les fruits [14], la viande [15], les poissons et fruits de mer. [16]

Malgré l'incompatibilité du PLA et du CHS, leur mélange est d'un grand intérêt pour les chercheurs vu ses différentes propriétés telles que la biodégradabilité, la biocompatibilité, l'activité anti microbienne, les propriétés mécaniques, etc. Des efforts ne cessent d'être déployés pour synthétiser le mélange de PLA et de CHS selon différentes techniques.

## Introduction Générale

---

Le présent manuscrit est constitué de trois chapitres, dont le contenu est présenté ci-après.

Le premier chapitre, présente une étude bibliographique portant sur les polymères biodégradables plus précisément l'acide Polylactique (PLA) et le chitosane extrait à partir des carapaces de crevette.

Le deuxième chapitre, présente une étude de deux différents travaux de CHENNI.A et BEN DHIEB.F et la discussion de leurs résultats.



## **I.1. Bioplastiques alternatives aux plastiques pétrochimiques:**

### **I.1.1. Introduction:**

Les bioplastiques sont des biopolymères biodégradables issus de matières premières renouvelables végétales ou animales. Les biopolymères sont des polymères présents dans des organismes vivants ou synthétisés par ceux-ci [17].

Depuis quelques années, un intérêt croissant est porté aux polymères biodégradables, en raison des stocks pétroliers qui sont amenés à diminuer à moyen terme, mais aussi en raison des problèmes de recyclage des polymères issus du pétrole. La valorisation de la biomasse est ainsi une solution très sérieusement envisagée pour répondre aux besoins du marché en matière plastique. Deux voies peuvent être envisagées : l'utilisation de la biomasse comme source de matière première pour l'industrie chimique et l'utilisation de la biomasse comme charge dans la production des matériaux composites

La biodégradabilité d'une substance se définit comme sa capacité à être entièrement décomposée en dioxyde de carbone et/ou méthane, en eau et en matière organique (biomasse) par les micro-organismes (bactéries, champignons, protozoaires) [18].

### **I.1.2. Classification des polymères biodégradables:**

Les polymères biodégradables présentent un domaine croissant [15]. Employés de plus en plus dans la production de masse comme l'emballage, papiers de revêtement, fibres, films et d'autres matériaux jetables [14]. Un grand nombre de polymères biodégradables (Ex. cellulose, chitine, amidon, polyhydroxyalkanoates, polylactide, polycaprolactone, collagène et d'autres polypeptides...) ont été synthétisés ou bien produits naturellement [12].

Selon l'origine des matières premières et des voies de synthèse, différentes classifications de polymères biodégradables sont proposées, on a chois de présenter la classification des polymères biodégradables selon leurs procédés de synthèse:

- Les polymères extraits de la biomasse comme agro-polymères (ex. cellulose ou amidon)
- Polymère obtenus par une production microbienne comme le polyhydroxyalkanoates (PHA)
- Polymères conventionnellement et chimiquement synthétisé à partir des monomères obtenus d'agro-ressources comme l'acide polylactique (PLA)
- Polymères obtenus par des ressources fossiles comme le polycaprolactone (PCL)

# Chapitre I : Etude Bibliographique

On peut classer ces polymères biodégradables en deux catégories : les agro-polymères et les polyesters biodégradables ou bien les bio-polyesters [18].

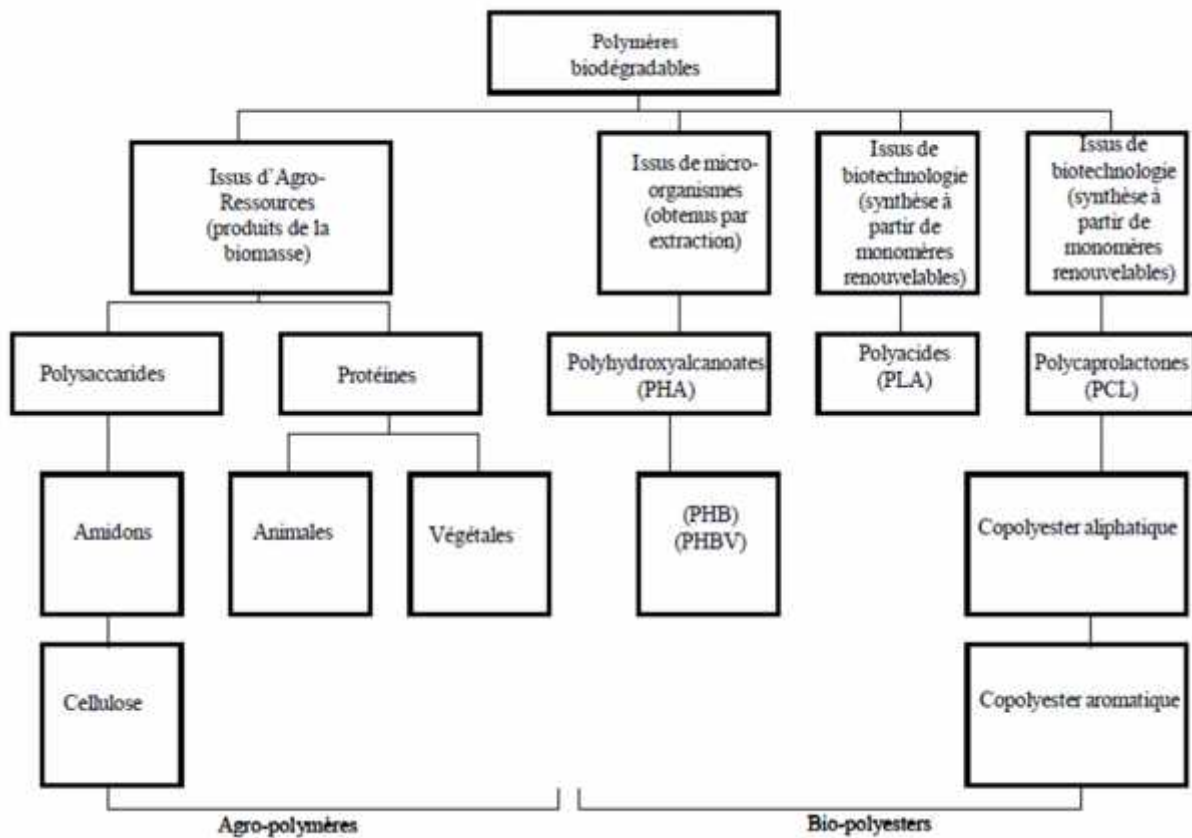


Figure I.1: Classification des polymères biodégradables [18]

## I.1.3. 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 [17].

### I.1.3.1. 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

## Chapitre I : Etude Bibliographique

---

résulte alors la formation de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O en présence d'oxygène (ou la formation de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O en anaérobique) 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. À l'opposé, les polymères pétrochimiques conventionnels comme le polyéthylène ou le polypropylène, dont le squelette carboné est constitué de liaisons covalentes C-C, requièrent beaucoup plus de temps et/ou la présence d'un catalyseur (thermique, radiation électromagnétique ou chimique) pour leur dégradation.

La propriété de biodégradabilité des biopolymères est intéressante pour des applications bien spécifiques comme l'emballage, l'automobile et le biomédical. Pour certaines applications dans le domaine de la construction, des matériaux stables non biodégradables sont plutôt recherchés.

La biodégradabilité des bioplastiques issus des polymères biodégradables ne dépend pas seulement des matières premières utilisées pour la conception, mais aussi de la structure chimique du matériau et de la constitution du produit final.

La biodégradabilité seule n'est pas suffisante. En effet, pour tirer profit de cette propriété, le matériau biodégradable doit être en plus compostable. La compostabilité introduit la notion de délai et des conditions de température et d'humidité bien spécifiques à la biodégradation. Le compost obtenu ne doit pas émettre des produits visibles et toxiques pour l'environnement. Le compost est valorisable en agriculture et en horticulture [17].

### **I.1.3.2. Perméabilité à la vapeur d'eau:**

La plupart des biopolymères comme l'amidon, la cellulose et les protéines sont hydrophiles, ce qui leur confère des propriétés de perméabilité à la vapeur d'eau. Ces propriétés sont dues notamment à la présence de fonctions polaires hydroxyle et/ou amine qui 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 [17].

### **I.1.3.3. 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 sont dégradés 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 pharmacutique pour les médicaments à libération contrôlée [17].

### **I.1.3.4. Propriétés chimiques:**

La présence de fonctions chimiques sur les molécules leur attribue des propriétés particulières et des facilités à 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 bio-monomères 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 [17].

## **I.1.4. Facteurs qui influencent la biodégradation:**

La biodégradation est influencée par un certain nombre de facteurs qui pourraient être regroupés en quatre catégories :

### **I.1.4.1. Paramètres physico-chimiques du milieu de dégradation:**

Ces paramètres sont essentiels et facilitent l'action des micro-organismes. Trois éléments rentrent en ligne de compte :

- La température qui favorise l'activité microbienne
- La teneur en eau du milieu qui doit être suffisante pour permettre aux fonctions des micro-organismes de s'exprimer
- Le pH [19].

### **I.1.4.2. Paramètres microbiologiques du milieu de dégradation:**

La présence de micro-organismes/enzymes spécifiques dans le milieu de dégradation va accroître le processus de dégradation.

Les micro-organismes suivant le cas, donneront lieu à une dégradation aérobie ou anaérobie (bactéries, cyanophycées) [19].

### **I.1.4.3. Structure et propriétés des polymères constituant le matériau:**

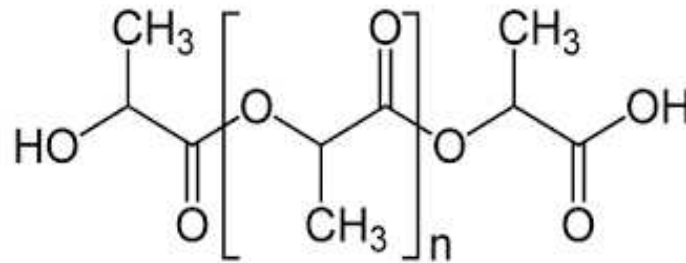
Le degré de polymérisation influence fortement la biodégradation. Un polymère faiblement cristallin et de masse molaire peu élevée est plus facile à dégrader. Par contre il sera difficile d'hydrolyser un polymère dont la structure est bien organisée (cristalline) [19].

### **I.1.4.4. Procédé de fabrication du matériau:**

Le procédé de fabrication envisagé (extrusion, injection, thermoformage ...) ainsi que les conditions de mise en forme du matériau (température, pression, utilisation de plastifiants, d'additifs) vont donner des matériaux aux caractéristiques très différentes tant au niveau de leur cristallinité que de leur composition ou encore de leur comportement vis à vis de l'eau, induisant des biodégradations différentes. Un matériau de grande pureté présentera des propriétés mécaniques importantes. L'épaisseur du matériau est également un paramètre déterminant dans le processus de dégradation d'un polymère. Généralement la cinétique de dégradation d'un matériau épais est relativement lente, si on considère une dégradation comme étant une érosion surfacique [19].

## I.1.5. Cas particulier du poly acide lactique (PLA) :

L'acide poly lactique (PLA), est une matière plastique créée par une synthèse classique, comme pour les matières plastiques synthétiques. Il s'agit en effet d'un polymère créé à partir d'un monomère d'acide lactique produit grâce à un processus de fermentation du glucose. Ce n'est qu'à partir des années 1990 que ce polymère connut un succès grandissant et fut produit industriellement. Il est devenu le premier polyester biosourcé fabriqué de manière industrielle en raison de la chute de ces coûts de production, de sa disponibilité commerciale et de ses applications potentielles [20]. Son principal avantage est qu'il est obtenu à partir des ressources renouvelables, à 100% riches en amidon tel que le maïs, la betterave ou la pomme de terre [4]. De plus, il est non toxique, biodégradable et présente des propriétés mécaniques très intéressantes comparables à celle des polymères classiques [21].



**Figure I.2:** Structure moléculaire du PLA

### I.1.5.1. Propriétés du PLA :

Le PLA est bien connu pour sa facilité de mise en œuvre, sa biocompatibilité et sa biodégradabilité (principalement par hydrolyse). Le PLA peut présenter différentes propriétés chimiques et physiques en raison de la présence d'un groupement méthyle sur l'atome de carbone alpha. Il est complètement soluble dans le chloroforme et dans d'autres solvants organiques comme : les fluorés, les chlorés, dioxane, dioxolane, furane, xylène, acétone etc.

Sa résistance aux huiles et aux graisses ainsi que ses propriétés barrières aux arômes sont excellentes. Cependant, il n'est pas approprié à l'emballage des liquides carbonates dû à sa faible barrière à l'oxygène O<sub>2</sub>, à la vapeur d'eau ainsi qu'au dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>).

PLA a des propriétés uniques comme la bonne apparence, haute résistance mécanique, faible toxicité et de bonnes propriétés barrière, ces propriétés ont élargi ses applications. De nombreux chercheurs ont étudié les différentes propriétés du PLA seul et en combinaison avec d'autres polymères comme mélange ou copolymère. [22]

### **I.1.5.2. Applications :**

Ce type de produits a été surtout destiné à des applications à haute valeur ajoutée à cause du prix élevé de la matière première. De nos jours, on continue avec ce type d'applications mais à cause de la diminution remarquable du prix, le PLA est envisagé pour la fabrication d'autres produits d'une valeur ajoutée plus basse.

#### **I.1.5.2.a. Applications médicales et pharmaceutiques :**

Les PLA sont bien adaptés à une utilisation comme matériel orthopédique à cause de leur biodégradabilité, biocompatibilité [22] et thermo-plasticité. Ils peuvent être utilisés pour fabriquer des prothèses pour le remplacement des os, des pièces plates d'acier, des broches, ou d'autres objets [23]. Les polymères d'acide lactique et d'acide glycolique peuvent être utilisés comme matrice dégradable pour la libération contrôlée de substances bioactives [24].

#### **I.1.5.2.b. Applications comme films/emballages :**

Durant les dernières années, en raison de la chute du prix du PLA, il est envisagé d'utiliser ce type de polymères dans le domaine des plastiques. De la même façon qu'avec d'autres types de polymères il est nécessaire d'ajouter des stabilisants, des inhibiteurs-UV, des plastifiants, des agents de renforcements ou d'autres additifs pour obtenir un matériau plastique répondant à un cahier des charges donné. Dans le cas du PLA, il faut chercher essentiellement à le stabiliser contre la dégradation thermique et à augmenter sa flexibilité et d'autres propriétés mécaniques dans le cas des films.

Pour la fabrication des films pour emballage, il est important d'assurer de bonnes propriétés barrières à la vapeur d'eau et aux gaz. Les propriétés barrière à la vapeur d'eau pour les films de PLA sont beaucoup plus mauvaises que dans le cas du PE ou PP, tandis que les propriétés barrières à l'oxygène sont meilleures. L'orientation bi-axiale, la co-extrusion et l'utilisation de différents revêtements peuvent améliorer les propriétés barrière à la vapeur d'eau.

Dans le cas des films en contact avec des aliments, il est nécessaire de choisir convenablement le plastifiant de façon à éviter des problèmes de migration. Il est possible aussi de fabriquer des films par coulage ou des feuilles à plat par extrusion qui peuvent être transformés après par thermoformage. Le PLA peut être utilisé, en substitution à d'autres matériaux plastiques comme le PE, pour la fabrication d'emballages en association avec le papier. Ce polymère a la fonction de barrière à l'humidité et, à la différence d'autres polymères de synthèse issus de la pétrochimie, il facilite le recyclage du papier ou son compostage [26].

# Chapitre I : Etude Bibliographique

---

## I.2.1. Généralités:

### I.2.1.1. Historique:

En 1811, le Pr. Henri Braconnot, Directeur du jardin biologique à Nancy (France) a isolé une substance fibreuse d'un certain type de champignon. Une décennie plus tard, en 1823, la même substance a été trouvée dans certains insectes (coléoptère) et a été ensuite nommée chitine (provient du mot grec "kitos" qui signifie l'enveloppe). En 1859, le Pr. C.Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin et a observé les différentes solubilités de la chitine. La substance, résultat du traitement alcalin, a pu être dissoute dans les acides. C'est en 1894 que cette substance a été nommée chitosane par Hoppe-Seyler.

Entre 1930 et 1940, ces biopolymères (la chitine et le chitosane) ont suscité beaucoup d'intérêt dans le monde oriental, principalement pour l'application dans le domaine médical et la purification de l'eau. Et depuis 1970, La production industrielle et l'utilisation de ces deux biopolymères sont en constante augmentation puisque qu'ils se trouvent abondamment dans la nature et sont des ressources renouvelables.

Actuellement, la production de la chitine et du chitosane à partir des carapaces de crabes et de crevettes, est économiquement rentable. [27]

### I.2.1.2. Chitine et Chitosane:

La chitine est le biopolymère le plus abondant dans la nature après la cellulose. C'est un polysaccharide, plus précisément un aminoglucopyranane, composé d'unités de N-acétyl D-glucosamine (GlcNAc) et de D-glucosamine (GlcN) (figure I.3), reliées par des liaisons covalentes  $\beta,(1 \rightarrow 4)$ . En raison de cette liaison spécifique, la chitine présente une structure extrêmement robuste qui entre dans la composition de la cuticule, ou exosquelette, des arthropodes (crustacés, insectes, arachnides) ainsi que dans l'endosquelette des céphalopodes (calamars, seiches). Elle est également présente dans les parois cellulaires de la plupart des champignons, de certaines levures et algues. Elle joue plusieurs rôles structurels et fonctionnels vitaux. Elle forme une barrière physique entre le corps de l'organisme et son environnement. Elle participe à sa protection contre les radiations, la chaleur, les agressions chimiques et physiques.

Le chitosane est le dérivé principal de la chitine. C'est un copolymère linéaire constitué d'unités D-glucosamine (GlcN) et N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) reliées par une liaison  $\beta,(1 \rightarrow 4)$ . Il se trouve, à l'état naturel dans la paroi cellulaire de certains



# Chapitre I : Etude Bibliographique

microorganismes (champignons, bactéries, levures et algues), mais dans des quantités relativement restreintes. Au niveau industriel, il est principalement produit par désacétylation de la chitine (figure I.4). La chitine et le chitosane possèdent la même structure chimique décrite dans la figure I.3 et ne se différencient que par la fraction molaire des motifs acétylés le long de la chaîne du polymère, appelée degré d'acétylation (DA), exprimé en pourcentage.

Généralement, on distingue la chitine du chitosane à partir de leurs propriétés de solubilité. La chitine (DA > 50%) est insoluble en milieux aqueux et dans les solvants organiques courants. Tandis que le chitosane (DA < 50 %) est fortement soluble dans les acides dilués [28].

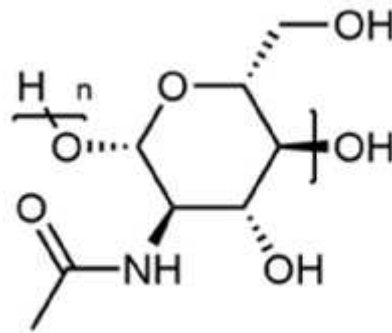


Figure I.3: Structure chimique de la chitine [28]

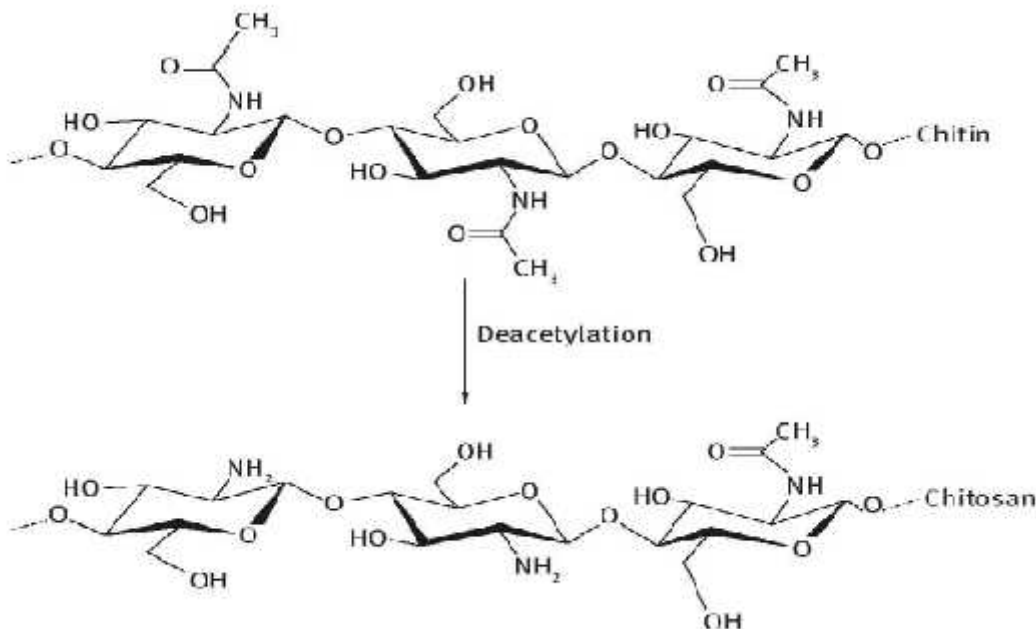
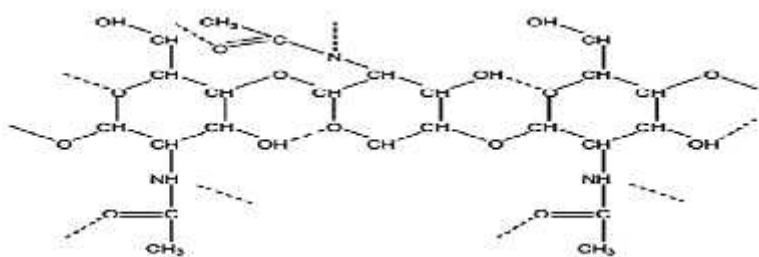


Figure I.4: Obtention du chitosane par désacétylation de la chitine. [28]

## I.2.1.3. Structure physique de la chitine:

La présence des groupements acétamide confère à la chitine des fonctions biologiques telles que la biodégradabilité et la biocompatibilité, ce qui fait de la chitine un matériau fonctionnel de grande importance. La chitine est caractérisée par une composition similaire à celle de la cellulose. Elle possède également une grande stabilité structurale due à la présence de fortes liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires figure I.5. Les principales caractéristiques d'un lot de chitine sont son degré d'acétylation et sa cristallinité. Ces paramètres sont importants car ils conditionnent bon nombre de ses propriétés.

La chitine présente trois formes cristallines,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Figure I.4), qui diffèrent par l'arrangement de la chaîne polysaccharidique et par la disposition des liaisons hydrogène. L' $\alpha$ -chitine est la forme la plus stable et la plus abondante, présente chez les crustacés et les champignons. Elle est caractérisée par des chaînes antiparallèles constituant une structure cristalline régulière. Les liaisons hydrogène intermoléculaires confèrent au polymère une grande stabilité vis-à-vis des solvants et des solutions aqueuses. Cependant, l'utilisation de solvants spécifiques tels que le N,N-diméthylacétamide (DMAc) contenant de 5-10 % de LiCl et des solutions à base de fluorine hexafluoroacétone et hexafluoro-2- propanol favorise la solubilisation de l' $\alpha$ -chitine. Cette solubilité dépend également de la source du polymère. Concernant la  $\beta$ -chitine, les macromolécules sont organisées sous un arrangement parallèle conduisant à des liaisons intermoléculaires de faible énergie. Dans ce cas les groupes N-acétyl jouent le rôle d'espaceurs, facilitant l'accès aux molécules d'eau, à des fins d'hydratation et de formation de gel. En opposition avec l' $\beta$ -chitine, la  $\gamma$ -chitine a une grande affinité pour les solvants organiques et l'eau. Elle se trouve essentiellement dans les épines des diatomées et l'endosquelette de seiche. La  $\gamma$ -chitine a été identifiée dans les cocons des insectes. Elle est principalement composée de 2 couches parallèles et 1 antiparallèle, sa force et sa résistance sont plus proches du type  $\alpha$ , les groupes N-acétyl jouant le même rôle dans ces deux arrangements. [28]



**Figure I.5 :** Les liaisons hydrogènes en pointillés dans la structure de la chitine. [28]



**Figure I.6 :** Arrangement des trois formes existantes de chitine :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  [29]

### I.2.1.4. Structure physique du chitosane

L'étude de la structure du chitosane est compliquée par les différentes voies possibles pour sa préparation et la variété des matériaux de départ disponibles. Comme l' $\alpha$ -chitine est le polymorphe le plus dominant de la chitine, elle est généralement utilisée comme matière de départ pour la désacétylation pour former du chitosane. Cependant, si de la chitine  $\beta$  ou  $\gamma$  a été utilisée, il est plausible qu'elles produisent différentes structures cristallines de chitosane.

Quatre conformations majeures du chitosane ont été trouvées; le polymorphe le plus abondant est celui d'un cristal hydraté. Dans ce polymorphe, le chitosane est conditionné de manière antiparallèle: les chaînes forment des liaisons hydrogène intermoléculaires entre les groupes hydroxyle en C6 et carbonyle des chaînes adjacentes pour former des feuilles. Comme dans la chitine, il existe également des liaisons intramoléculaires entre C3 et C5. Cette structure est stabilisée par la présence de molécules d'eau entre ces feuilles empilées, qui forment des liaisons hydrogènes avec les chaînes de chitine dans le sens A.

Cela reflète la différence majeure entre la structure du chitosane et celle de la chitine. Du fait de la désacétylation, la liaison hydrogène entre les protons amide et les groupes carbonyle dans la direction A n'est plus présente, ce qui permet aux chaînes de se séparer les unes des autres dans cette direction. Comme le réseau de liaison hydrogène n'est plus présent dans les trois directions, le chitosane est libre d'adsorber l'eau et ainsi les caractéristiques de solubilité augmentent.

En réalité, la chitine et le chitosane existent sous forme d'hétéropolymères d'unités monomères acétylées et désacétylées. Le schéma de désacétylation, qui n'est généralement pas uniforme, régira la structure et les propriétés du matériau, par conséquent, la détermination du DA du matériau est essentielle pour déterminer ses propriétés physico-chimiques [28].

# Chapitre I : Etude Bibliographique

## I.2.1.5. Disponibilité de la chitine :

La chitine est l'un des polymères naturels les plus abondants sur le globe avec la cellulose. Ces deux polysaccharides sont similaires du point de vue de leur structure et leurs fonctionnalités. La chitine entre dans la composition de la cuticule des arthropodes et de certains mollusques (les céphalopodes), dans la paroi de certains microorganismes tels que les micro-algues et les moisissures. Les teneurs en chitine varient d'une espèce à l'autre. Le tableau I.1 montre les écarts qui existent selon les ressources disponibles pour produire la chitine [29].

**Tableau I.1 : Teneur en chitine par espèces**

Sources	Teneur en chitine (en % mat sec)	Sources	Teneur en chitine (en % mat sec)
Arthropodes	2 à 72	Crabes chionoecetes opilio	26,6
Mollusques	6 à 40	Crevettes Pandallus borealis	17,0
Ponophores	33	Crevettes Cangron cangron	33
Cnidaires (capsules œufs)	3 à 30	Crevettes Penaeus monodon	3 à 30
Annélides	0,2 à 38	Ecrevisses Procamborus darkia	0,2 à 38
Brachiopodes	4 à 29	Bouquet	4 à 29
Champignons	2,9 à 20,1	Plume de calmar	2,9 à 20,1
Algues/ Lichen	Faible	Krill Euphasia superba	Faible

## I.2.2. Propriétés physico-chimique :

### I.2.2.1. Degré de désacétylation (DD) ou le degré d'acétylation (DA) :

Le procédé de désacétylation implique l'élimination des groupements acétyle de la chitine, produisant un composé (chitosane) avec un groupement amine chimiquement très réactif (-NH<sub>2</sub>). Cela donne au degré de désacétylation (DD) une propriété importante dans la production de chitosane car il affecte ces propriétés physico-chimiques, et donc déterminer les applications appropriées. La désacétylation affecte également la biodégradabilité et l'activité immunologique. Le degré de désacétylation du chitosane varie du 56 % à 99% avec une moyenne de 80% selon le crustacé et les méthodes de préparation [22].

Le degré d'acétylation (DA) est défini comme étant la fraction molaire des unités acétylées (unité acétyle glucosamine). Le degré de désacétylation (DDA=1-DA) représente la proportion d'unités amine-D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités glycosidiques.

## Chapitre I : Etude Bibliographique

---

Le degré d'acétylation (DA), peut être obtenu soit par titration volumétrique soit par des méthodes spectroscopiques comme l'infrarouge (IR), ou l'ultraviolet. D'autres analyses sont aussi utilisées comme :

- La spectroscopie à résonance magnétique (RMN) du  $^1\text{H}$ .
- La spectroscopie à résonance magnétique (RMN) du  $^{13}\text{C}$
- L'hydrolyse acide.
- La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).
- l'analyse élémentaire.
- La spectrophotométrie.
- Le titrage colloïdal.

La méthode la plus fréquemment utilisée pour l'estimation du DA du chitosane, est la spectroscopie IR proposée pour la première fois par Moore et Roberts en 1980 [30].

### **I.2.2.2. Cristallinité :**

La cristallinité est un paramètre important car elle contrôle un certain nombre de propriétés comme l'accessibilité des sites internes dans les chaînes macromoléculaires, les propriétés de gonflement dans l'eau ou encore les propriétés diffusionnelles. La cristallinité est, en général, déterminée par des mesures de diffraction de rayons X. Le chitosane est généralement une substance 0semi-cristalline. Il cristallise dans le système et deux types de produits sont connus : le chitosane I (faible DD, sous forme de sel) est plus désordonné que le chitosane II (fort DD, forme amine libre) [31].

### **I.2.2.3. Solubilité :**

La chitine est insoluble dans la plupart des solvants organiques [31], et la solubilité du chitosane dépend en général, de la valeur de DD, de la force ionique, du pH, de la nature de l'acide utilisé et de la distribution des groupes acétyles le long de la chaîne macromoléculaire [31].

Le chitosane est soluble facilement dans les solutions acides diluées de pH  $\sim$  6. Ceci est dû au fait que le chitosane peut être considéré comme une base forte car il possède des groupements amines primaires avec une valeur de pKa  $\sim$  6.3. La présence des groupements amines indique que le pH influence sensiblement les propriétés du chitosane. La protonation des groupements amines a eu lieu à des faibles valeurs de pH et se chargent positivement, ce qui fait du chitosane un polyélectrolyte cationique hydrosoluble. D'autre part lorsque le pH augmente au dessus de, les groupements amines du chitosane se déprotonisent et le polymère

## Chapitre I : Etude Bibliographique

---

perd sa charge et devient insoluble. La transition soluble-insoluble se produit autour de la valeur pKa du chitosane et donc vers un pH entre 6 et 6.5. Comme la valeur de pKa dépend fortement du degré d'acétylation, la solubilité du chitosane dépend du DD et la méthode de désacétylation utilisées [22].

### **I.2.2.4. Viscosité :**

La viscosité du chitosane dépend du degré de désacétylation de ce polymère. Plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amines libres, le chitosane est donc plus soluble et par conséquent sa viscosité est plus importante. La viscosité dépend également : de la concentration du polymère (elle augmente avec la concentration), de la température (elle chute lorsque la température augmente), du poids moléculaire (la viscosité intrinsèque augmente en fonction du poids moléculaire) et enfin du pH (plus il est bas plus la viscosité est élevée). Ce paramètre est déterminé par viscosimètre [32].

### **I.2.3. Propriétés biologiques :**

La chitine et le chitosane sont non toxiques, biocompatibles et biodégradables. Tout comme la cellulose, ils sont des amino-polysaccharides et présentent des propriétés biologiques, physiologiques et pharmacologiques intéressantes. Leurs bio-activité notables comprennent la promotion de la guérison des blessures, l'activité hémostatique, l'amélioration immunitaire, l'activité hypolipidémique, la muco-adhésion, l'élimination des réponses biologiques et l'activité antimicrobienne.

Le chitosane est également prometteur en tant que polymère de support pour la délivrance de gènes, la culture cellulaire et l'ingénierie tissulaire. Dans la pratique médicale les tissus non tissés de chitine et les fils de chitine sont utilisés comme peaux artificielle et sutures avec les avantages de cicatrisation, biocompatibilité et biodégradabilité. La chitine et le chitosane favorisent évidemment la guérison des blessures et permettent une restauration cosmétique de haute qualité.

En raison de l'activité hémostatique remarquable, des bandages de chitosane sont utilisés par les paramédicaux pour arrêter instantanément les saignements. Les fibres et les éponges de coton de la chitine et de chitosane sont maintenant couramment utilisées par les vétérinaires japonais comme pansement ou agent de remplissage pour animaux.

Certains oligomères de chitine et de chitosane ont les fonctions physiologiques, y compris l'induction de phytoalexines, l'activité antimicrobienne et l'activité de renforcement

# Chapitre I : Etude Bibliographique

---

immunitaire. Par exemple, les hexamères (GlcNAc) et (GlcN) présentaient des effets inhibiteurs de croissance contre des cellules tumorales. Ils sont solubles dans l'eau et facilement injectés par voie intraveineuse. Bien que des études détaillées soient encore en cours pour élucider les fonctions biologiques ou physiologiques de ces oligomères, elles semblent être utiles dans les domaines de la médecine, de l'alimentation, des cosmétiques et de l'agriculture.

Des études récentes sur l'activité antibactérienne ont révélé que le chitosane est efficace pour inhiber la croissance bactérienne. Les propriétés antimicrobiennes du chitosane dépendent de son poids moléculaire et de souches bactériennes. Le chitosane a généralement montré des effets bactéricides plus forts pour les bactéries gram-positif que pour les bactéries gram-négatif en présence de 0.1% du chitosane.

La chitine et le chitosane *in vitro* ont montré des propriétés et activités antibactériennes et anti-levures. L'inhibition de la croissance des moisissures et des levures dépendent de la concentration, du pH et la température du chitosane.

Le revêtement de chitosane retarde significativement la détérioration des fruits ou la décomposition des fruits et légumes tels que les tomates, les fraises, etc ; à différentes températures. Les fruits enrobés de chitosane étaient non seulement plus fermes et plus riches en acidité titrable, mais étaient lents à se décomposer et présentaient moins de pigmentation que les échantillons de contrôle à la fin du stockage. Le chitosane de faible poids moléculaire a un effet inhibiteur plus important contre les phytopathogènes que le chitosane de poids moléculaire élevé [22].

## **I.2.4. Application :**

### **I.2.4.1. Agroalimentaire :**

La chitine et ses dérivés sont largement utilisés dans les produits alimentaires à valeur ajoutée, la formation de films biodégradables, la conservation des aliments par les microbes, la récupération des déchets de la transformation des aliments, la purification de l'eau, la désacidification des jus de fruits et leur clarification. Les applications de la chitine et de ses dérivés comme additifs alimentaires comprennent : la stabilisation des couleurs, agent épaississant, agent émulsifiant, diluant d'arôme naturel...etc.

La chitine peut également être appliquée pour la production de films comestibles, par exemple pour contrôler le transfert d'humidité entre la nourriture et l'environnement, le

## Chapitre I : Etude Bibliographique

---

transfert de chaleur, le taux de respiration, la libération d'antioxydants et également le brunissement enzymatique des fruits [22].

### **I.2.4.2. Emballage antimicrobien :**

Les propriétés antimicrobiennes du chitosane ont également été utilisées comme emballage actif comestible. Des biofilms ont été formés à partir de chitosane qui permet le stockage à long terme de produits alimentaire. Le traitement antimicrobien des légumes, des fruits, des grains et du poisson retarde l'attaque microbienne, car le chitosane agit comme une barrière protectrice pour améliorer la qualité sensorielle et nutritionnelle de l'aliment. En plus d'être une barrière protectrice, des films comestibles peuvent être utilisés comme supports de composés bioactifs pour améliorer la qualité des aliments. Les films bioactifs peuvent être combinés avec différents agents antimicrobiens tels que les acides organiques, les bactériocines, les extraits végétaux, les protéines, les antibiotiques, les fongicides et les agents chélatants (EDTA) pour réduire la dégradation des aliments par des microorganismes pathogènes et améliorer la durée de conservation [22].



**Figure I.7 :** Des exemples d'objets de chitosane moulés, colorés avec des colorants hydrosolubles [22]

### **I.2.4.3. Traitement des eaux :**

La plus large utilisation du chitosane est dans la clarification des eaux usées et des effluents. La prise de conscience des problèmes écologiques et sanitaires liés aux métaux lourds et les pesticides, et leur accumulation dans la chaîne alimentaire a incité la nécessité d'une purification rigoureuse de l'eau industrielle avant sa décharge pour l'utilisation.

La chitine a été rapportée comme étant utile dans la chélation des métaux lourds contenus dans les eaux usées industrielles. La chitine est non toxique et peut se lier aux polluants communs. Cette liaison est constituée de mercure, cuivre, fer, nickel, chrome,



## Chapitre I : Etude Bibliographique

plomb, zinc, cadmium, d'argent et de cobalt. Les résultats montrent que la liaison la plus forte a lieu avec le mercure et la plus faible avec le cobalt.

L'utilisation du chitosane pour la purification de l'eau potable a été approuvée par l'agence américaine de protection de l'environnement (USEPA), jusqu'à un maximum de 10ppm [22].

### I.2.4.5. Agriculture :

Le chitosane et ses dérivés ont des propriétés antifongiques et protectrices des plantes, déclenchant un mécanisme de défense chez les plantes contre les infections et les attaques de parasites, même à de très faibles concentrations. Il est utilisé sous forme de solution ou de revêtement de la semence. Il agit à différents niveaux, en renforçant le système racinaire et en épaississant la tige. Il agit aussi tel un fertilisant en accélérant la germination et la croissance des plantes [29].

Il a été confirmé que les graines de blé traitées par la chitine, ont une croissance accélérée due aux additions de la chitine au mélange du sol et de la plante, provoquant une diminution évidente de la pénétration des insectes et des champignons pathogènes [22].



**Figure I.8 :** Engrais, pesticides et fongicides d'oligosaccharides chitosane sous forme liquide organique naturel produits par Qingdao Jingling Ocean Technology.[22]

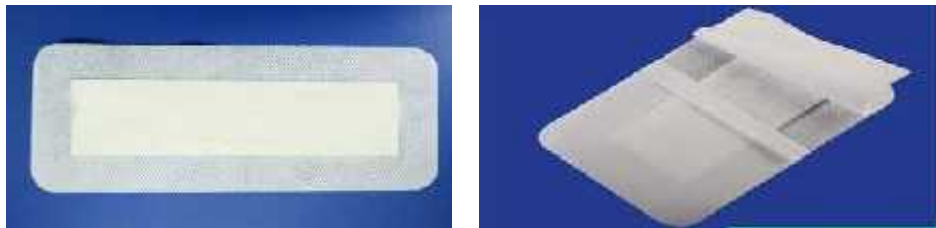
### I.2.4.6. Pharmaceutique :

Les propriétés biologiques, de biocompatibilité et bioactivité du chitosane permettent de nombreuses applications pharmaceutiques, biomédicales et cliniques. Il trouve de ce fait des applications en tant que revêtement d'objets mis en contact avec le sang comme les prothèses vasculaires ou les valves cardiaques [33].

Le chitosane accélère la cicatrisation des plaies, ces propriétés cicatrisantes sont également utilisées pour fabriquer des fils de structure et des dispositifs chirurgicaux utilisés

comme pansement lors d'opérations ou de peaux artificielles utilisables dans le traitement des grands brûlés.

Ces précieux polymères La chitine et le chitosane et leurs dérivés peuvent encapsuler des principes actifs, les protéger contre la dégradation et permettre leur libération sur une période prolongée. Différents systèmes polymériques d'encapsulation tels que des nanoparticules, des matrices, des microsphères, des hydrogels, des capsules ou des micelles ont été étudiés [22].



**Figure I.9 :** Différents types de pansements à base de chitine/chitosane produits par Shandong Cheerain Medical [22]

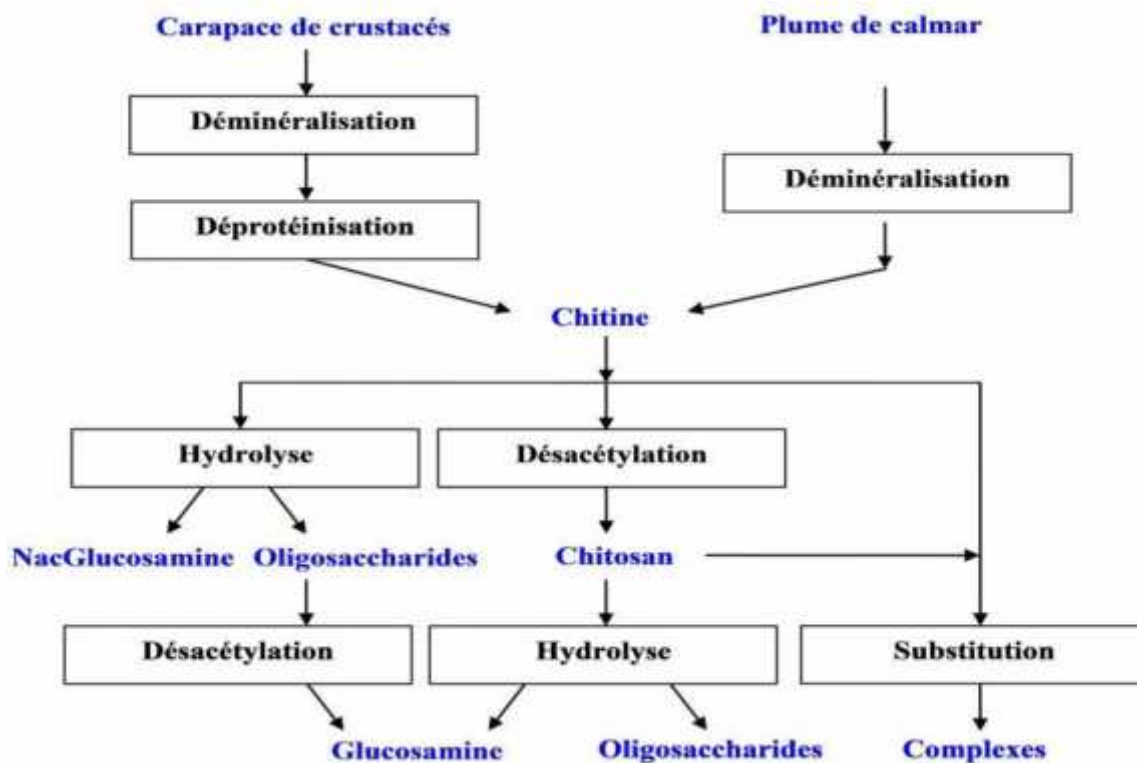
### **I.2.4.7. Cosmétique :**

Le chitosane est utilisé dans les crèmes et les lotions et quelques-uns de ses dérivés sont aussi utilisés dans la préparation des vernis à ongles. Le chitosane dépolymérisé et la carboxyméthyle chitine ont été utilisés comme éléments actifs dans des produits tels que le shampoing et le revitalisant vu la viscosité de leurs solutions aqueuses, leur caractère filmogène, leur capacité de rétention d'humidité et leur adoucissement de la peau et des cheveux [33].

### **I.2. 5. Production de la chitine et de ses dérivés par voie chimique :**

La production de chitine repose sur la purification de la matière première. L'attention est principalement portée sur l'élimination du carbonate de calcium et des protéines. Bien que ce procédé réponde à la définition d'une purification, nous continuerons à employer l'abus de langage généralement admis qui consiste à parler d'extraction de la chitine.

L'extraction chimique consiste en un traitement acide pour la déminéralisation et un traitement alcalin pour la déprotéinisation. Les autres composés minoritaires sont supposés être entraînés au cours de ces deux réactions. La déminéralisation précède généralement la déprotéinisation car l'inverse aurait un impact sur les deux traitements [22]. Entre chaque étape, le produit est rincé abondamment à l'eau déminéralisée. La figure I.10 schématise un exemple de production de chitine et de ses dérivés.



**Figure I.10 :** Procédé industriel de fabrication de la chitine et de ses dérivés

En amont, la préparation de la matière première est indispensable pour réduire les risques de dégradation de la chitine. Les modes opératoires sont propres à chaque entreprise, souvent basés sur le séchage pour éviter l'autolyse naturelle [22].

### I.2.5.1. La déminéralisation :

La déminéralisation est habituellement réalisée avec de l'acide chlorhydrique (HCL) dilué (jusqu'à 10%) à une température ambiante avec agitation pour dissoudre le carbonate de calcium CaCO<sub>3</sub>. Les concentrations en HCl sont généralement comprises entre 0,5 et 11 N et le ratio substrat/solvant entre 1/10 et 1/40. La déminéralisation dure entre 15 min et 48 h, de la température ambiante à 50 °C. Il faut prendre garde à la production de mousse, causée par le dégagement de CO<sub>2</sub>. Elle peut être limitée par l'ajout d'un agent anti-moussant.

La réaction avec le carbonate de sodium est achevée lorsque le dégagement de CO<sub>2</sub> cesse.



La déminéralisation est suivie par une étape de rinçage car le produit doit atteindre la neutralité avant l'étape suivante de déprotéinisation

## Chapitre I : Etude Bibliographique

Le degré de déminéralisation est un indicateur de la performance de la déminéralisation, il est défini par la formule **équation (I.1)** suivante [22] :

$$\%DM = \frac{(AOMC) - (A_i)}{AOMC} \times 100 \quad (\text{I.1})$$

*%DM est le degré de déminéralisation, Mo et Mr sont les masses initiale et résiduelle du produit hydrolysé, Ao et Ar les pourcentages de cendres dans le produit initial et résiduel respectivement.*

### I.2.5.2. La déprotéinisation :

La chitine se trouve naturellement en association avec la protéine (chitino-protéine). Un traitement basique permet d'éliminer les protéines par solubilisation. Les réactifs employés pour cette étape sont des bases fortes comme l'hydroxyde de potassium (KOH). Le plus courant, pour des raisons d'économie et technique, est l'hydroxyde de sodium (NaOH).

Les déchets de carapaces de crustacés sont habituellement broyés et traités avec une solution d'hydroxyde de sodium dilué (1-10%) à des températures élevées (65-100°C) pour dissoudre les protéines présentes. Le temps de réaction varie habituellement de 0.5 à 12h selon la méthode de préparation. Un long traitement alcalin dans des conditions sévères provoque une dépolymérisation et une désacétylation.

Pour obtenir une uniformité de réaction, il est recommandé d'utiliser des rapports relativement élevés entre le solide et la solution alcaline de 1/10 ou 1/15-20 avec une agitation appropriée.

Le degré de déprotéinisation est un indicateur pour suivre l'efficacité de la réaction, il est défini par la formule **équation (I.2)** suivante [22]:

$$\%D = \frac{(PCM) - (P_i)}{PCM} \times 100 \quad (\text{I.2})$$

### I.2.5.3. La décoloration :

Cette étape est optionnelle, elle n'est pas nécessaire si les facteurs temps-température durent pour des longues périodes. Cependant il est très difficile d'obtenir un produit pur à cause de la coloration des produits peut être la réaction de Maillard qui implique les groupes azotés et les aldéhydes

## Chapitre I : Etude Bibliographique

---

Généralement, l'agent de blanchiment employé est le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), dont la concentration est comprise entre 0,1 et 33%, il peut également être mélangé avec du HCL. La durée du traitement est souvent très courte, de l'ordre de quelques minutes [22].

### **I.2.5.4. Désacétylation de la chitine**

Si l'extraction de la chitine est aujourd'hui facilement réalisable, l'étape la plus délicate reste la désacétylation qui nécessite de substituer suffisamment les groupements acétyles pour aboutir au chitosane, ce qui peut entraîner une réduction excessive de la longueur de la chaîne du polymère. En jouant sur la durée du traitement alcalin et sur l'augmentation de température, il est donc possible d'obtenir différents chitosanes à partir d'une même chitine. Un DA inférieur à 10% est rarement atteint par un procédé simple, la désacétylation totale nécessite plusieurs étapes. L'échantillon étant soit lavé, dissous et re-précipité entre deux cycles.

De nombreuses combinaisons des conditions de désacétylation sont décrites dans la littérature. Généralement, la chitine est chauffée au-delà de 80°C (jusqu'à 150°C), dans une solution de NaOH (ou KOH) concentrée entre 40 et 60 %, selon un ratio W /V entre 1/5 et 1/45, pendant au moins 10heures. Le degré d'acétylation obtenu est généralement compris entre 30 et 50 %

Il existe plusieurs facteurs critiques qui affectent le processus de la désacétylation, comme la température, le temps du traitement, la concentration de la solution alcaline, le traitement préalable appliqué à l'isolation de la chitine, l'atmosphère (air ou azote), le rapport de la chitine) la solution alcaline et la densité de la chitine et la granulométrie. Considérant toutes ces conditions comme nécessaires, le but idéal de la désacétylation est de préparer un chitosane en évitant sa dégradation durant la réaction et aussi d'avoir la propriété d'être soluble dans une solution d'acide dilué dans un temps minimal [22].

## Chapitre II : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

L'objectif de cette partie A est l'étude des méthodes utilisées dans les différents travaux suivants :

- Thèse CHENNI Abdenour « Elaboration et caractérisation des composites et nanocomposites à base des Poly (acide lactique) chargés de chitosane et de la Cloisite<sup>®</sup>30B » Université de BEJAIA.
- Mémoire MASTER 2 présenté par BEN DHIEB Fatma « Développement et caractérisation de films biodégradables à base d'acide polylactique et de chitosane » Université de LAVAL

### II.1. Matériaux et méthodes expérimentales

#### II.1.1. Matériaux et produits:

Tableau II.1. Produits chimiques et appareils utilisés

Produits Chimiques	Matières premières	Appareilles
Acide Chlorhydrique (HCL)	Carapaces de crevettes	Etuve
Hydroxyde de Sodium (NaOH)	chitine commerciale	Blender
Hypochlorite de Sodium (NaClO)	chitosane commercial	Cristallisateur
Acide Acétique (CH <sub>3</sub> COOH)	chitosane extrait	Bain marie
Chlorure de Sodium (NaCl)	Polyacide Lactique (PLA)	spectrophotomètre
Chloroforme (CHCl <sub>3</sub> )	Souches bactériennes	infrarouge
Ethanol (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH)		Balance
Acide Lactique (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> )		Potentiomètre.
Glycérol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )		Centrifugeuse.
polyéthylène glycol		
L'eau distillée		

La matière première utilisée dans la thèse de CHENNI.A est l'exosquelette des crevettes récupérées au niveau des restaurants locaux de béjaia. Ces déchets appartiennent à deux types de crevettes de grande consommation locale nommés *Aristeus antennatus* et *Parapenaeus longirostris*.



**Figure II.1 :** Type de crevettes utilisés ((à droite) *Aristeus antennatus* et *Parapenaeus longirostris* (à gauche) ) et les carapaces récupérés

### **II.1.2. Méthodes expérimentales :**

#### **II.1.2.1. Extraction de la chitine et du chitosane :**

Cette partie s'intéresse à l'extraction de la chitine et du chitosane à partir des carapaces de crevettes récupérées, par un prétraitement des carapaces suivis par des traitements acido-basiques.

##### **II.1.2.1.a. Prétraitement des carapaces de crevettes récupérées :**

Les carapaces de crevettes sont donc collectées débarrassées de tous les antennes et pattes ainsi que de la chaire résiduelle de la décortication. Lavées avec de l'eau de robinet et séchées à l'air ambiant pendant 2 jours. Un deuxième lavage a été effectué avec une eau chaude (60°C) avec agitation magnétique pour but de se débarrasser des résidus libres de la chaire ainsi que des lipides. Après plusieurs filtrations, la masse récupérée est lavée abondamment avec de l'eau distillée, puis séchée dans une étuve à 60°C pendant 24 heures. Et broyée au blender.



**Figure II.2 :** Fragments des carapaces des crevettes obtenus après le prétraitement



### II.1.2.1.b. Extraction de la chitine :

L'extraction chimique consiste en une déminéralisation acide et une déprotéinisation basique effectué par CHENNI.A.

#### ➤ Déminéralisation

Avec un taux de présence compris entre 30 à 50 %, le carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) est le constituant majoritaire des carapaces de crevettes. Afin d'éliminer le carbonate de calcium, on verse 600g de fragments de carapaces prétraitées dans un cristalliseur contenant une solution d'acide chlorhydrique (1N) avec un ratio (M/V 1/15). Le mélange est magnétiquement agité à la température ambiante pendant 1 heure. La réaction avec le carbonate de sodium est achevée lorsque le dégagement de  $\text{CO}_2$  cesse. Finalement le contenu du cristalliseur a été filtré sur une toile filtrante et lavé abandonnement avec de l'eau distillée.

#### ➤ Déprotéinisation et décoloration

Le retentât est introduit dans un cristalliseur, dans lequel un volume de NaOH 2 M est versé avec un ratio (M/V 1/15). La déprotéinisation dure 2 h dans un bain marie à 60 °C avec agitation. 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 quand l'eau de rinçage n'est plus colorée, l'eau distillée est remplacée par un volume de 15 ml d'hypochlorate de sodium ( $\text{NaClO}$ ) pour blanchir le produit. Un ultime rinçage avec de l'eau distille permet d'entraîner les impuretés lipidiques résiduelles. Le filtrat est alors transféré dans une étuve à 60°C pendant 24 heures, la chitine extraite est présentée dans Figure II.3



**Figure II.3. :** Chitine extraite



### II.1.2.1.c. Déacétylation de Chitine et obtention du Chitosane :

La déacétylation de la chitine extraite est effectuée on la traitant avec une solution basique NaOH de forte concentration (12,5 M), un ratio (M/V 1/15) chauffé à 100 °C pendant 5 heures, à la fin du traitement le contenu du cristalliseur est filtré et lavé abandonnement avec de l'eau distillé. Le produit ainsi obtenu est étalé sur une plaque et séché dans une étuve pendant 24h à une température de 60°C, puis broyée pour obtenir le chitosane sous forme d'une poudre.



Figure II.4 : Poudre de chitosane

### II.1.2.2. Prétraitement du mélange PLA/chitosane :

Des films de PLA, chitosane PLA/CHS ont été préparés en solution par voie humide. A cet effet, du chitosane (2% en masse) a été dissous dans une solution d'acide acétique(0,17M) et du PLA (2% en masse) a été dissous dans 100 ml du chloroforme. Ensuite les deux solutions ont été mélangées avec un agitateur magnétique jusqu'à l'obtention de solution homogènes. Les mélanges ainsi obtenus ont été versés par la suite dans des boites pétries sous vide à température ambiante pendant 3 jours.

Tableau II.2. Composition massique (en % massique) des films préparés en solution.

Films	PLA(%)	CHS(%)
PLA	100	-
CHS	-	100
PLA/CHS( 95/5)	95	5
PLA/CHS (90/10)	90	10
PLA/CHS (85/15)	85	15
PLA/CHS (80/20)	80	20

### II.1.2.3. Plastification du chitosane :

Dans cette partie deux différents plastifiants ont été utilisés, CHENNI.A a utilisé le glycérol pour la plastification du chitosane et BEN DHIEB.F a opté pour le polyéthylène glycol

#### ➤ En présence d'acides organiques et du glycérol :

En premier temps, les solutions d'acide acétique et d'acide lactique ont été préparées avec de l'acide acétique glacial et de l'acide lactique dilué à une concentration de 3 mol/L. Afin d'élaborer les échantillons non plastifiés, on a tout d'abord ajouté les solutions d'acide acétique et d'acide lactique à la poudre de chitosane ensuite on a mélangé manuellement jusqu'à l'obtention des pâtes avec une bonne homogénéité. Dans le cas des échantillons plastifiés, du glycérol a été ajouté goutte à goutte à la poudre de chitosane. Ensuite, les solutions d'acide acétique et d'acide lactique ont été ajoutées doucement et mélangées manuellement. Le rapport chitosane / glycérol est maintenu constant pour tous les échantillons préparés à 75/25 (% en poids). Ensuite, les pâtes non plastifiées et plastifiées ont été mélangées dans un bras blender à 65 °C pendant 15 minutes avec une vitesse constante de rotation du rotor de 50 rpm. Finalement, les pâtes obtenues à la fin du processus ont été moulées à chaud sous pression à 270 bars à 110°C pendant 10 minutes pour obtenir des feuilles et des films. Le refroidissement est effectué à la température ambiante pendant 10 minutes et sous 150 bars. L'épaisseur des films préparés est inférieure à 1 mm pour l'IRTF, la perméabilité à la vapeur d'eau. Les différentes formulations sont résumées sur le tableau II.3 avec les nomenclatures correspondantes. Tous les échantillons préparés sont conservés dans un dessiccateur sous vide et caractérisés après 24 h, la teneur en eau de tous les échantillons a été mesurée à l'aide d'un analyseur d'humidité infrarouge avant la caractérisation des échantillons, les valeurs sont résumées sur le tableau II. 4.

**Tableau II.3 :** Composition massique en % et nomenclatures des échantillons non-plastifiés et plastifiés.

Samples	Chitosane/acide acétique (% massique)	Chitosane /acide lactique (% massique)	Chitosane/glycérol (%massique)
CHS <sup>a)</sup> /ACac <sup>b)</sup>	36/64	-	-
CHS/ACLac <sup>c)</sup>	-	28/72	-
CHS/Gly <sup>d)</sup> /ACac	36/64	-	75/25
CHS/Gly/ACLac	-	28/72	75/25

a) Chitosane ; b) Acide Acétique ; c) Acide Lactique ; d) Glycérol

**Tableau II.4.** Teneur en eau des différents échantillons préparés.

Echantillons	Teneur en eau (% en volume)
CHS/ACac	0.84
CHS/ACLac	1.25
CHS/Gly/ACac	1.50
CHS/Gly/ACLac	1.90

### ➤ En présence d'acides organiques et du polyéthylène glycol (PEG) :

Pour le système CHS/PLA, on dissout séparément le chitosane dans une solution aqueuse à 2% d'acide acétique à raison de 1g par 50 ml, et le PLA dans le chloroforme. On rajoute ensuite les deux solutions de PLA et de CHS et on maintient l'agitation jusqu'à obtenir une solution homogène. On rajoute ensuite le PEG et on continue l'agitation. On transverse par la suite la solution dans un contenant et on sèche à la température ambiante pendant 24 à 48h, dépendamment des films et on fait ensuite un séchage sous vide à 50°C pendant 5h.

### II.1.3. Techniques de caractérisations :

#### II.1.3.1. Teneurs en eau et en cendres :

Pour estimer la part d'eau dans les produits extraits, 1 g de chaque échantillons sont prélevés et pesés dans une coupelle de poids connu. La coupelle est placée 24 h dans une étuve à 60°C, puis pesée après 30 min de refroidissement (équation (II-01)).

Le principe de la détermination de la teneur en minéraux repose sur leur résistance à la chaleur. Environ 1 g d'échantillon est pesé dans une feuille de papier en aluminium de poids connu. Elle est repliée et placée au moins 3 h à 600 °C  $\pm$ 5°C. Après refroidissement, elle est de nouveau pesée. Les masses des cendres résiduelles est assimilé à la teneur en minéraux (équation (II-02)). La teneur en eau et en cendres sont déterminée dans la matière première et dans les produits d'extraction.

$$T_H (\%) = \frac{M - M_f}{M} \times 100 \quad (\text{II-01}); \quad T_c (\%) = \frac{M_i}{M_f} \times 100 \quad (\text{II-02})$$

$T_H\%$  est la teneur en humidité,  $M_i$  est la masse initiale de l'échantillon,  $M_f$  est la masse après séchage est de nouveau pesé.  $T_c (\%)$  est la teneur en cendres,  $M_i$  et  $M_f$  sont les masses avant et après incinération Respectivement

### II.1.3.2. Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge est un moyen de diagnostic permettant de déterminer la nature des liaisons chimiques présentes dans une molécule. Ainsi, la spectroscopie infrarouge est un très puissant moyen de caractérisation pour identifier des groupements moléculaires et obtenir de nombreuses informations microscopiques sur leur conformation et leurs éventuelles interactions. L'échantillon est soumis à un rayonnement électromagnétique dans la gamme de longueur d'onde du centre infrarouge ( $2,5 \mu\text{m} < \lambda < 50 \mu\text{m}$ ). Le champ électrique induit par l'onde électromagnétique peut interagir avec un moment dipolaire d'une entité moléculaire présente dans le matériau. Lorsque la fréquence de champ coïncide avec la fréquence de vibration d'un mode propre de la molécule, l'interaction créée engendre la vibration de certaines liaisons et l'absorption de l'énergie de l'onde excitatrice correspondante.

#### II.1.3.2.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  $\alpha$  de la forme  $\beta$  et parfois pour déterminer le degré d'acétylation.

Des échantillons de carapaces de crevettes, de la chitine et le chitosane extraits ainsi que la chitine et le chitosane commerciaux, 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 IRAffinity - ICE Shimadzu (Japon) a été utilisé, les spectres IR des échantillons (de chitine extraite, la chitine commerciale, carapaces de crevettes, le chitosane extrait et le chitosane commercial) ont été enregistrés dans le mode d'absorption dans la gamme de  $400 \text{ à } 4000 \text{ cm}^{-1}$ , les spectres des échantillons sont alors comparés entre eux et ceux de la littérature.

#### ➤ Détermination de degré de déacétylation (DD) Par spectroscopie infrarouge :

La spectroscopie FTIR permet de déterminer le degré d'acétylation et en se basant sur la valeur du degré d'acétylation on peut déduire la valeur du degré de déacétylation sachant que  $DD\% = 100\% - DA\%$ . Le principe repose sur le rapport des aires entre les bandes caractéristiques de la N -acétylglucosamine, de la glucosamine ou de la chitine. Les degrés de déacétylation de tous les échantillons étudiés dans ce présent travail ont été calculés en utilisant l'équation (II.03) suivante (Baxter et al) [34].

$$DD\%=100 - [(A_{1658} / A_{3450}) \times 115] \quad (\text{II.03})$$

*Ou ;  $A_{1658}$  et  $A_{3450}$  sont l'absorbance à  $1658 \text{ cm}^{-1}$  de l'amide I en tant que mesure de la teneur en groupes N-acétyle et l'absorbance à  $3450 \text{ cm}^{-1}$  de la bande d'hydroxyle ; 115 est le coefficient de correction de la ligne base.*

### **II.1.3.2.b. Caractérisation des films par spectroscopie IR-TF**

L'analyse par spectroscopie IR-TF nous permet de détecter les nouvelles liaisons dans le mélange et voir l'influence de l'ajout du plastifiant sur les liaisons déjà existantes à travers la variation de leur fréquence et de leur intensité.

### **II.1.3.3. Test de solubilité de la chitine et du chitosane :**

La solubilisation se réalise par protonation des groupements  $-\text{NH}_2$  sur la position  $-\text{C}-2$  de l'unité répétée D-glucosamine, ou le polysaccharide est converti en un polyélectrolyte dans un milieu acide.

CHENNI.A a testé la solubilité du chitosane extrait en dissolvant 1g du chitosane extrait dans 100ml d'une solution d'acide acétique (0,17M), le même test est effectué pour la chitine extraite à fin de confirmer l'identification des deux échantillons.

### **II.1.3.4. Perméabilité à la vapeur d'eau :**

Concernant la perméabilité à la vapeur d'eau deux méthodes ont été utilisées par BEN DHIEB.F (première méthode) et CHENNI.A (deuxième méthode) :

Dans la première méthode le MOCON PERMATRAN a été utilisé suivant les normes ASTM F1249-90 et ASTM D-6701. Cette méthode consiste à mettre le film dans une chambre de test séparant deux espaces, l'un a une humidité relative (HR) de 90% et celle de l'autre est de 0%. Dans la partie humide, on fait circuler la source de pénétration qui est l'azote, et dans la partie sèche on fait circuler le gaz vecteur. Ce dernier va ramener les molécules d'eau qui ont pu traverser le film vers la sortie de la chambre, là où il y a un détecteur IR qui mesure cette quantité.

La deuxième méthode «Cup method» selon la norme ISO 7783. Ce procédé consiste à faire remplir un récipient cylindrique en acier avec une poudre séchante et scellé avec des coupes de films à étudier. 10 g de  $\text{CaCl}_2$ , a été utilisé comme poudre déshydratante à  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  avec une humidité relative de 50 % et le diamètre des coupons de films à tester est de 8 cm.

## Chapitre II : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

---

Ce procédé consiste à mesurer la variation de la masse de la poudre séchante en fonction du temps.

Des mesures de masses ont été prises régulièrement pour contrôler, l'évolution de la masse du sel (correspondant à sa prise en eau). Enfin, les valeurs de la transmission de la vapeur d'eau (TRVE) et de taux de perméabilité (PVE) ont été calculées en utilisant l'équation (II.4) et (II.5), sachant que tous les résultats représentent une valeur moyenne obtenue de trois tests effectués.

$$\text{TRVE} = m / (t \cdot A) \quad (\text{II.4})$$

$$\text{PVE} = (\text{TRVE} \cdot e) / P \quad (\text{II.5})$$

Avec:

*PVE: perméabilité de la vapeur d'eau (g/m<sup>2</sup>\*h\*Pa), TRVE: taux de transmission de vapeur d'eau (g/m<sup>2</sup>\*h), e: épaisseur de Film (m) et P : différence de pression partielle de la vapeur d'eau (Pa).*

### **II.1.4. 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 les propriétés antibactériennes du chitosane (CHS) extrait sous forme de poudre par la méthode de dilution en liquide (en gélose et en bouillon). Les films de PLA, CHS, et les mélanges PLA/CHS 5(100/0 ; 95/5 ; 90/10 ; 85/15 et 80/20% en poids) ont été testés par la méthode de diffusion en gélose.

#### **II.1.4.1. Etude de l'activité antibactérienne du chitosane extrait et des films PLA pur, Chitosane pur et PLA/CHS :**

L'activité antibactérienne du chitosane extrait dans cette étude est testée contre quatre types de souches bactériennes pathogènes (2 bactéries à gram positifs et 2 bactéries à gram négatifs): Escherichia coli, Staphylococcus Aureus, Salmonella typhimurium. Listeria monocytogenes. La méthode choisie dans notre étude pour évaluer cette activité est la méthode de dilution en gélose avec une détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), les résultats obtenus ont été confirmés par un test de dilution en milieu solide.

## Chapitre II : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

---

Pour l'étude de l'activité antibactérienne des films de PLA pur, Chitosane pur, PLA/CHS, la méthode de diffusion en gélose a été utilisée contre les souches *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonelle typhimurium*, *Enterococcus*

### **II.1.4.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la méthode de dilution en liquide et en solide:**

La CMI est définie comme la plus faible concentration d'un antibiotique inhibant en 18 à 24 heures la multiplication des bactéries (bactériostase). Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories : "sensible" ; "résistante" ; "intermédiaire".

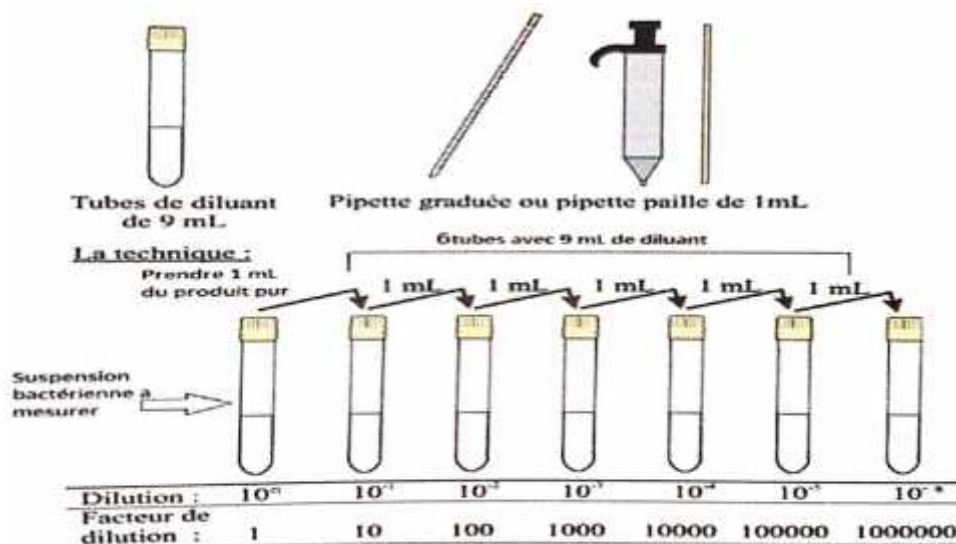
Les déterminations des CMI par la méthode des dilutions en série présentent donc une variation d'une dilution inhérente à la méthode. Les gammes antimicrobiennes doivent entourer à la fois les critères interprétatifs (sensible, intermédiaire, et résistant) pour une combinaison bactérie/antimicrobien spécifique, et les témoins qualité de référence des organismes appropriés. Les méthodes de sensibilité antimicrobienne en dilution semblent être plus reproductibles et quantitatives que la diffusion en disque en gélose.

#### ➤ **Dilution en bouillon :**

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide de composition prédéterminée et documentée.

En premier lieu, des souches bactériennes ont été préparées et ciblées par une dilution successive selon le protocole suivant ; présentée sur la figure II.5 :

- ) Homogénéiser la suspension microbienne à prélever
- ) Ouvrir et flamber l'ouverture du tube
- ) Prélever 1mL de suspension à l'aide d'une pipette plastique stérile
- ) Flamber et refermer le tube
- ) Ouvrir le tube de 9mL de diluant, flamber l'ouverture y introduire le volume prélevé
- ) Flamber et refermer le tube



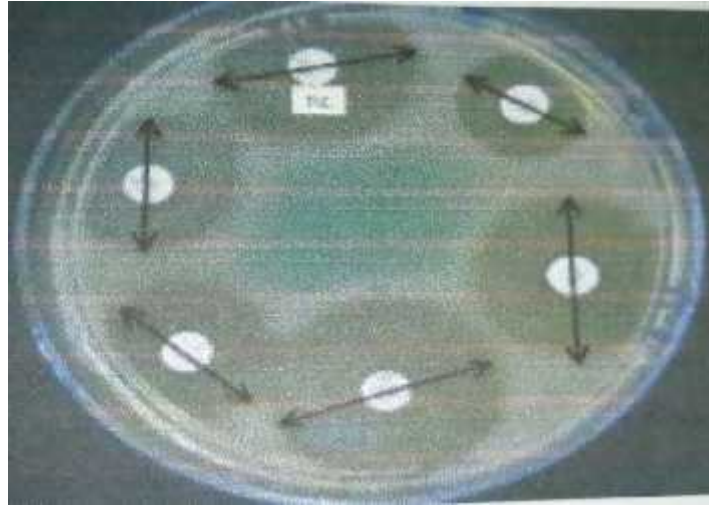
**Figure II.5 :** Préparation des souches bactériennes par dilution successive

L'étude de l'activité antibactérienne du chitosane extrait a été dosée comme suit : des solutions de chitosane extrait ont été préparées dans 1% d'acide acétique à une concentration de 0,17 M avant d'être introduites au bouillon et chaque solution a été ajoutée au bouillon Muller Hinton pour donner une concentration finale en chitosane de 1%. Les 1ml de chaque bactérie repiqués dans un bouillon nutritif à 37°C pendant 24h ont été introduits dans 9ml du bouillon nutritif ajusté à pH 6 et incubé à 37°C pendant 24h avec agitation à 100tr/min. Pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice des chitosanes, des solutions de chitosane extrait a été dilué pour des concentrations finales de 1% à 0,1%. La CMI a été définie comme la concentration la plus faible de chitosane nécessaire pour inhiber complètement la croissance bactérienne.

### ➤ Dilution en gélose :

La diffusion en disque se réfère à la diffusion d'un agent antimicrobien d'une concentration spécifique à partir des disques, tablettes ou bandes, dans le milieu de culture solide, qui a été ensemencé avec l'inoculum choisi et isolé en culture pure. La diffusion en disque comme le présente la figure II.6 est basée sur la détermination d'une zone d'inhibition proportionnelle à la sensibilité bactérienne à l'antimicrobien présent dans le disque. La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de culture ensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien.





**Figure II.6.** Exemple d'un test d'activité antibactérienne par diffusion en gélose

Des cultures de toutes les souches bactériennes ont été cultivées dans un bouillon nutritif à 37°C pendant 24h. Les souches bactériennes sélectionnées représentent des groupes d'organismes pathogéniques présents dans divers types de produits alimentaires. Des tests d'activité antimicrobienne ont été réalisés en utilisant la méthode de diffusion en gélose.

Avant d'effectuer les tests, les films préparés ont été découpés sous forme de carrés de 1cm<sup>2</sup> de surface et stérilisés dans un autoclave puis placés dans les boîtes de pétri contenant de la gélose Mueller-Hinton, préalablement étalée avec 0,1 ml de chaque inoculum. Les boîtes de pétri ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24h. L'activité antibactérienne de chaque matériau a été évaluée en observant la formation d'une zone d'inhibition de la croissance.

### II.2. Résultats et discussions:

#### II.2.1. Teneur en eau et en cendres :

La teneur en eau est un paramètre important dans les emballages alimentaires ; selon les travaux de recherche de CHENNI.A, la teneur en eau ( $T_h\%$ ) des carapaces de crevettes est beaucoup plus supérieure à celle de la chitine et du chitosane (tableau II.5), cela est dû à la présence d'une grande quantité d'eau dans le résidu protéique contenu dans les carapaces prétraitées. Par ailleurs la teneur en eau de la chitine est supérieure à celle du chitosane extrait cela est expliqué par le fait que la chitine a subi un séchage avant sa déacétylation. Les teneurs en cendre de la chitine et du chitosane sont très faibles comparées à celle des carapaces de crevettes (28%) ce résultat est due à la déminéralisation efficace que ces carapaces ont subies. Des résultats comparables à ceux rapportés par des études antérieures Younes et al. [35], Rao et al [36]

Les conditions de déminéralisation utilisées dans cette étude réduisent la teneur en minéraux aux limites admissibles dans la chitine. En effet, la teneur en cendre a été réduite à environ 6,30 %, une valeur supérieure à celle trouvée par Benhabiles et al [37]. Isa et al [38].

Un chitosane d'excellente qualité doit avoir une teneur en cendre inférieure à 1 %. La teneur en cendre de la chitine est faible par rapport à celle du chitosane cela est peut être attribué à la présence des groupements acétyles dans la structure de la chitine. Ces résultats sont en accord avec Isa et al [38], Fernandez-Kim [39].

**Tableau II.5:** Teneurs en eau et teneur en cendre de la chitine et du chitosane extraits.

Echantillons	Teneur en eau ( $T_h\%$ )	Teneur en cendre ( $T_c\%$ )
Carapaces de crevettes	55,48	28
Chitine extraite	10,25	6,25
chitosane extrait	6,80	8,60

#### II.2.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformation de Fourier (IRTF) :

##### II.2.2.1. Caractérisation de la chitine et du chitosane extraits:

Les spectres infrarouges obtenus par CHENNI.A des carapaces de crevettes récupérées, la chitine extraite ainsi que la chitine commerciale sont représentés sur les figures II.5 (a, b, c) respectivement. Le spectre infrarouge des carapaces de crevettes (figure II.5 a) montre la présence des pics caractéristiques de la calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) à 2521, 1785, 1422, et 876  $\text{cm}^{-1}$ , le

## Chapitre II : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

pic d'absorption à  $1546\text{ cm}^{-1}$  est attribué à la région d'absorption des protéines et aussi la présence de la  $\alpha$ -chitine a  $1650, 1072$  et  $585\text{cm}^{-1}$ . Le spectre de la chitine extraite est représenté sur la (figure II.5b) Toutes les bandes observées par l'IRTF de la chitine extraite sont détaillées dans le tableau II.6.

D'après le tableau II.6, les pics d'absorption à  $1658$  et  $1625\text{ cm}^{-1}$  sont attribués à la bande amide I et à la vibration d'élongation de la liaison C=O respectivement, ce qui est typique pour la  $\alpha$ -chitine, en revanche dans le cas de la  $\beta$ -chitine un unique pic d'absorption vers  $1626\text{ cm}^{-1}$  a été enregistré, aussi la disparition des pics caractéristique de la calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) ont été remarqués ( $2521, 1785, 1422, 876\text{ cm}^{-1}$ ).

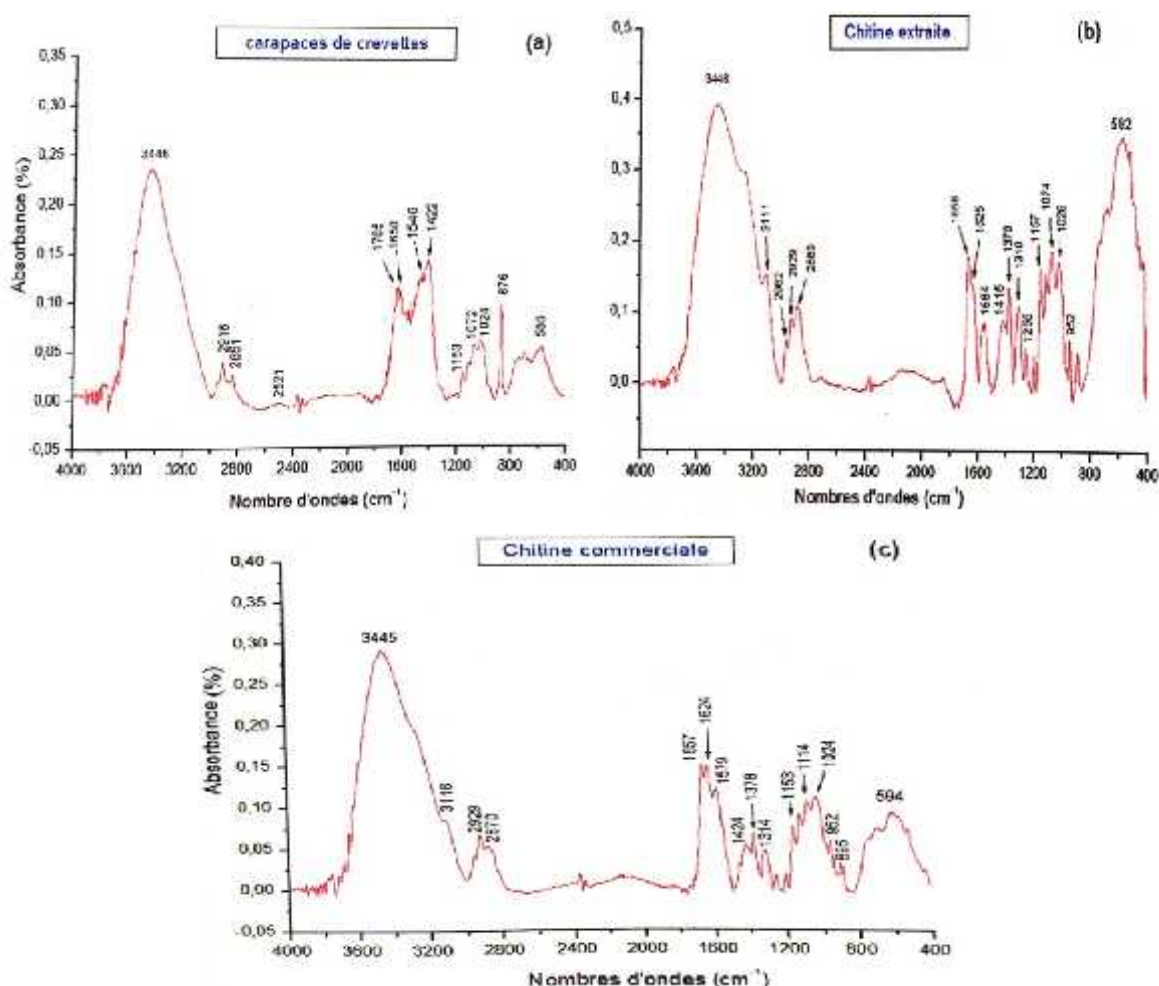
**Tableau II.6 :** Les bandes d'absorptions caractéristiques de la chitine extraite.

Nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ )	Liaison et types de vibrations
3446	Vibration d'élongation du (O-H...O)(liaison hydrogène intermoléculaire)
3111	Vibration d'élongation du N-H
2962	Vibration d'élongation $\text{CH}_3$ (antisymétrique)
2929	Vibration d'élongation $\text{CH}_2$ (symétrique)
2889	Vibration d'élongation CH
1658,1625	Vibration d'élongation C=O(Amide I ,bifurcation des liaisons intermoléculaire ponts hydrogène C=O...NH et O-H...O=C)
1564	Vibration d'élongation C-N et de déformation dans CONH(Amide II)
1415	Vibration de déformation C-H (antisymétrique)
1379	Recourbement de CH et déformation (symétrique) du $\text{CH}_3$
1310	Vibration d'élongation du C-N et de déformation du N-H (Amide III), agitation hors du plan du $\text{CH}_2$
1255	Vibration de déformation du NH (Amide IV)
1157	Vibration d'élongation du C-O-C (liaison oxygène asymétrique)
1074,1028	Vibration d'élongation de C-OH
953	Agitation hors du plan de $\text{CH}_3$
897	Recourbement hors plans C-H (cycle glucose, liaison )
582	Recourbement hors plan C-C

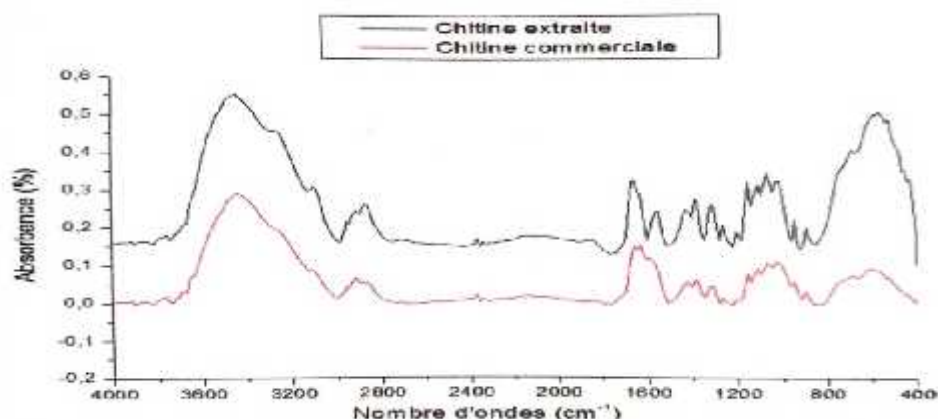
## Chapitre II : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

D'après la figure II.7.b, il a été noté que des pics d'absorption intenses vers 1658 et 1564  $\text{cm}^{-1}$ , typiques pour les groupements amides et ils correspondent respectivement aux vibrations d'élongation des groupements carbonyle, présent dans la chitine ( $\nu(\text{C}=\text{O})$  nommé Amide I) et de groupement amine ( $\nu(\text{NH}_2)$  nommé Amide II). En outre, l'absence de pics vers la région 1540  $\text{cm}^{-1}$ , là où généralement les protéines nous donnent d'intenses pics d'absorption.

Par ailleurs, l'apparition de nouveaux pics à 896, 1255, 1379, 1564 et 3111  $\text{cm}^{-1}$  ont été observés, ces résultats confirment que la structure de la chitine extraite est bien celle de la chitine. Finalement, la figure II.8 montre une similitude significative entre la chitine commerciale figure II.7.c et la chitine extraite figure II.7.a



**Figure II.7 :** Spectres infrarouges des carapaces des crevettes non traitées (a) ; chitine extraite (b) ; chitine commerciale (c)

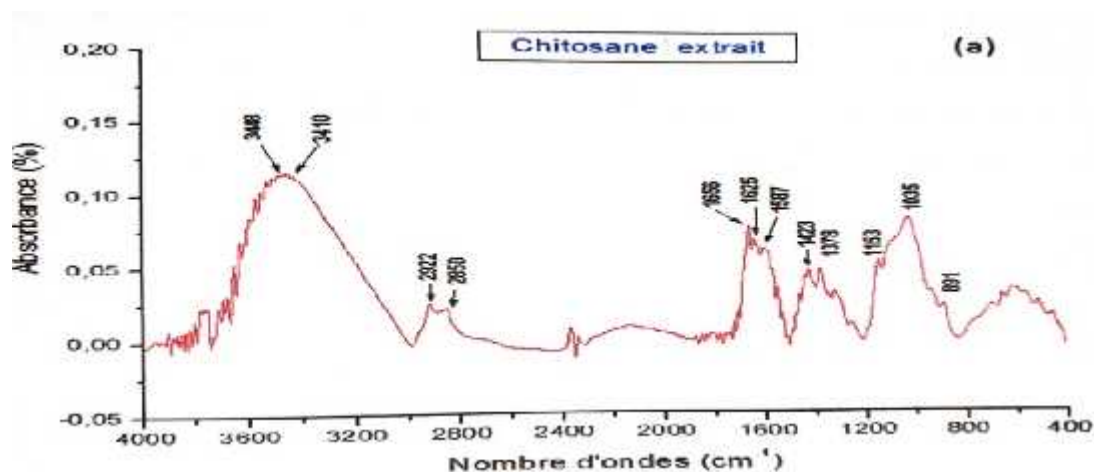


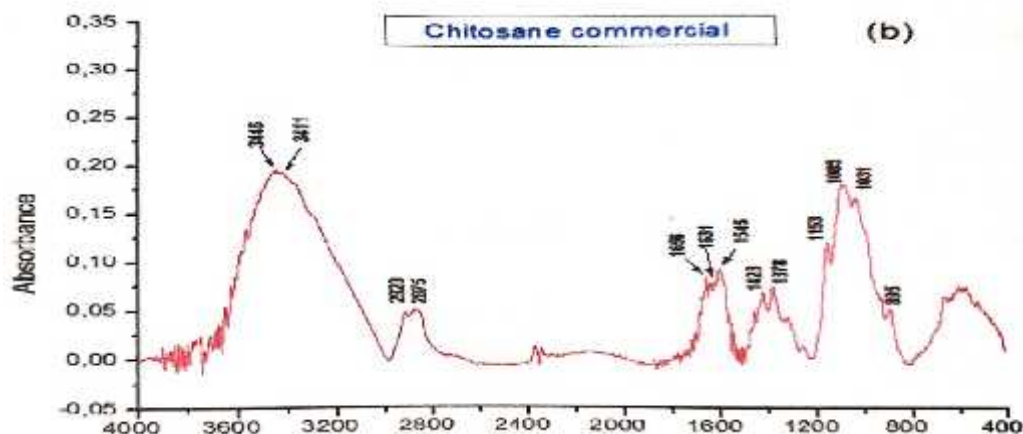
**Figure II.8 :** Spectres infrarouge des échantillons chitine extraite et de chitine commerciale superposée

La figure II.9.a présente le spectre FTIR du chitosane extrait où les pics caractéristiques du chitosane ont été observés, sont résumés dans le tableau II.7.

D'après le spectre FTIR du chitosane on remarque des pics d'absorption à 1656 et à 1587 cm<sup>-1</sup> qui correspondent respectivement à la bande d'absorption des carbonyles (C=O) dans le groupement NHCOCH<sub>3</sub> (bande amide I) et la bande d'absorption des amines (-NH<sub>2</sub>) dans le groupement NHCOCH<sub>3</sub> (bande amide II). La bande à 1378 cm<sup>-1</sup> est attribuée à la vibration d'élongation de la liaison C-N (bande amide III), des pics d'absorption à 3448, 3410, 2922, 1625 et à 1153 cm<sup>-1</sup> sont attribués respectivement à la vibration d'élongation du groupement OH et de la liaison H--N du groupe NH<sub>2</sub>, élongation asymétrique de la liaison C-H des méthylènes, la déformation des groupements NH<sub>2</sub> et vibration d'élongation symétrique de la liaison -C-O-C- (Liaisons glucosidique).

Les mêmes bandes ont été enregistrés pour le chitosane commercial figure II.9.b ce qui confirme la structure du chitosane extrait





**Figure II.9 :** Spectres infrarouge du chitosane extrait (a) et commercial (b).

**Tableau II.7 :** Pics caractéristiques enregistrés dans le spectre du chitosane extrait

Nombres d'ondes (cm <sup>-1</sup> )	Liaison et type de vibration
3448	Vibration d'élongation du (O-H...O) (liaison hydrogène intermoléculaire)
3410	Vibration d'élongation de la liaison N-H du groupe NH <sub>2</sub>
2922	Elongation asymétrique de la liaison C-H des méthylènes
2851	Elongation symétrique de la liaison C-H des méthyles
1656	Vibration d'élongation C=O ( Amide I)
1626	Déformation angulaire de la liaison N-H des amides
1587	Déformation angulaire de la liaison N-H des amines
1423	Vibration de déformation C-H (antisymétrique)
1378	Vibration d'élongation du C-N et de déformation du N-H (Amide III)
1153	Vibration d'élongation du C-O-C ( liaison oxygène symétrique )
1036	Vibration d'élongation de C-OH dans l'acétamide
891	Vibration du squelette circulaire du pyranose

➤ **Détermination du degré de déacétylation (DD%) par la méthode IRTF :**

Le degré de déacétylation de la chitine (extraite, commerciale) ainsi que le chitosane (extrait et commercial) est calculé en utilisant l'équation (03), les valeurs obtenues du DD sont résumées dans le tableau II.8. Les résultats obtenus du DDA pour la chitine extraite ainsi que le chitosane extrait confirment l'identification de ces deux coproduits effectuées par spectroscopie infrarouge (IRTF).

## Chapitre II : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

**Tableau II.8 :** Degrés de déacétylation (DD%) des échantillons de chitine et de chitosane (extraits et commerciaux)

Echantillons	Chitine Extraite	Chitine commerciale	Chitosane extrait	Chitosane commercial
Degré de déacétylation	24.27	17.86	79.48	82

### II.2.2.2. caractérisation des mélanges PLA/CHS extrait:

Les spectres FTIR obtenus par CHENNI.A de PLA vierge, le chitosane pur et des mélanges de PLA/chitosane (95/5 et 90/10) sont présentés sur la figure II.10.

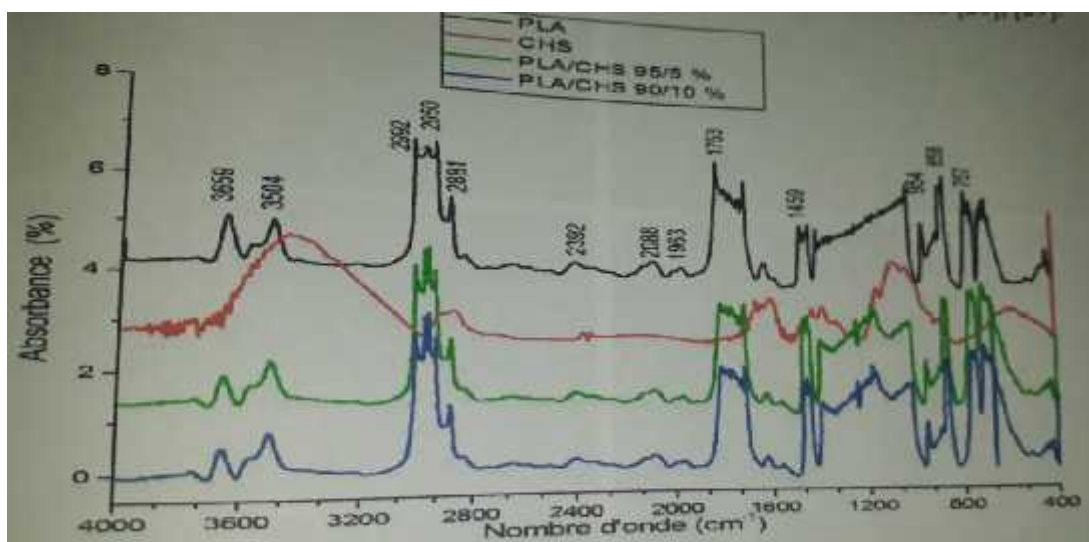
Le spectre FTIR de chitosane pur présente les bandes d'absorption caractéristiques attribuées aux structures des polysaccharides. Les principales bandes qui apparaissent dans le spectre sont: une bande intense et large à  $3448\text{ cm}^{-1}$  attribuée au groupement OH à l'élongation du groupement N-H, pics d'absorption et d'élongation des CH détectées à  $2870\text{-}2880\text{ cm}^{-1}$ , le pic à  $1655\text{ cm}^{-1}$  associé à l'absorption d'élongation de la liaison C=O acétamide (amide I), la bande enregistrée à  $1580\text{ cm}^{-1}$  correspond à la déformation angulaire de la liaison NH du groupement amine, les bandes à  $1420\text{-}1477\text{ cm}^{-1}$  résultant de l'élongation des groupements CN et de la déformation angulaire des groupements NH. Enfin, des vibrations d'absorption et d'élongation des liaisons glycosidiques sont enregistrées entre  $1150\text{ cm}^{-1}$  et  $900\text{ cm}^{-1}$ .

Le spectre FTIR du PLA Vierge a clairement enregistré les bandes d'absorption caractéristiques dans les régions  $3500\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ ,  $3000\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$  et  $1753\text{ cm}^{-1}$  correspondant respectivement, aux vibrations de flexion et d'élongation des groupements OH, vibration d'élongation asymétrique des CH et vibration d'élongation du groupement C=O.

Les régions d'interactions dans les mélanges PLA chitosane (95/5 et 90/10) comparés au PLA vierge, démontrent que les bandes d'absorption caractéristiques principales de PLA vierge à  $1753\text{ cm}^{-1}$  et  $858\text{ cm}^{-1}$  sont déplacées vers des nombres d'ondes plus faibles lors de l'addition du CHS (5% et 10 %).

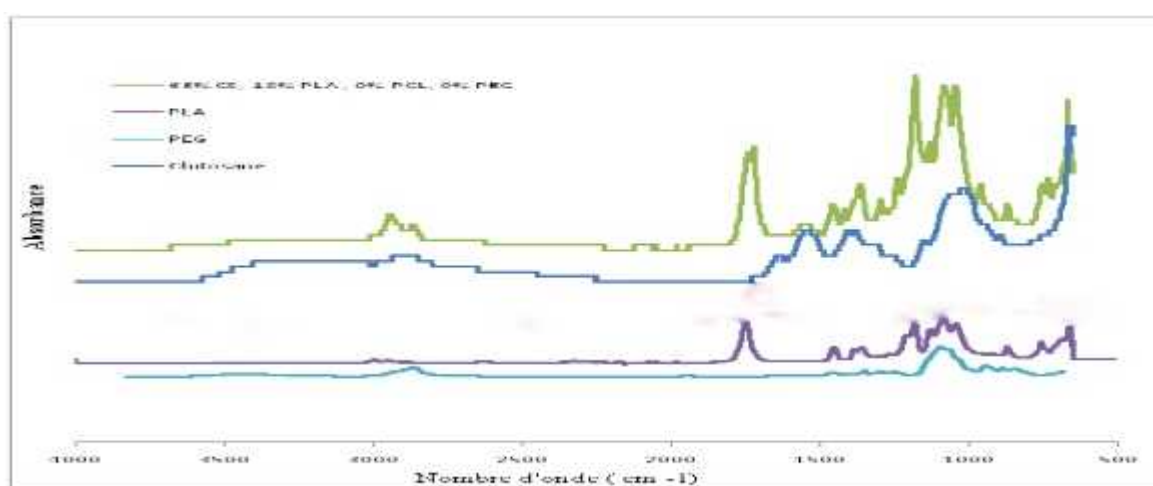
Il a également été constaté que l'intensité de la bande large à  $2950\text{-}2992\text{ cm}^{-1}$  et  $3504\text{ cm}^{-1}$  a significativement diminué par l'ajout de CHS. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'addition de CHS (5% en poids et 10% en poids) à la matrice de PLA a conduit à la formation des interactions entre les deux composants.





**Figure II.10:** spectre FTIR de PLA, CHS, PLA /CHS 95/5%, PLA/CHS 90/10%

D'après les spectres obtenus par BEN DHIEB.F Le pic à  $1538\text{ cm}^{-1}$  est caractéristique du groupement amine du chitosane, son atténuation dans le spectre du mélange indique que des liaisons hydrogène se sont formées entre le chitosane et le reste des polymères du mélange. Dans le spectre du PLA, les pics à  $756$  et  $870\text{ cm}^{-1}$  sont attribués à la phase cristalline et amorphe du PLA, respectivement. A part ces pics, le reste du spectre est une superposition des spectres des polymères purs. C'est ce qui explique l'intensité de certains pics tels que celui à  $1738\text{ cm}^{-1}$  et celui à  $1170\text{ cm}^{-1}$ . A  $1738.3\text{ cm}^{-1}$ , on a un pic intense qui représente les groupements carbonyles du PLA, placés à  $1733\text{ cm}^{-1}$ , ce qui démontre que peu de groupements ester a réagi. A  $1170\text{ cm}^{-1}$ , le pic s'intensifie par rapport à celui du PLA pur, vu qu'il correspond à l'étirement de la liaison C-O du PLA.

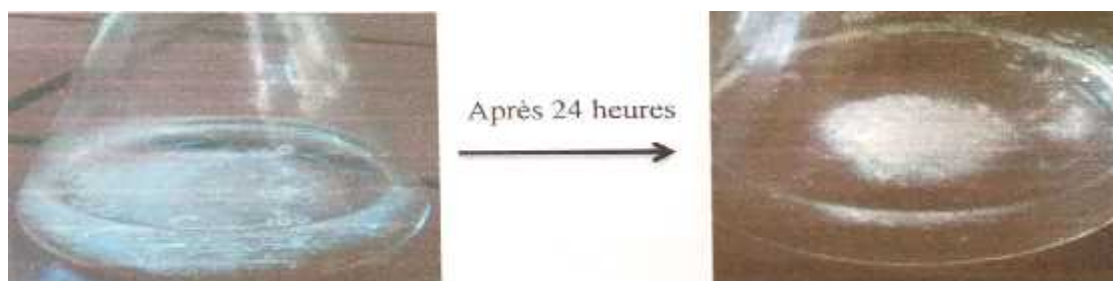


**Figure II.11:** Spectres IR-TF du film avec 63% de CHS, 18% PLA et 9% PEG (1) et des polymères purs le composant : (2) CHS, (3) PLA, (5) PE



### II.2.3. Test de solubilité :

Les Figures II 12 et 13 représentent respectivement les photographies du test de solubilité de la chitine extraite dans l'acide acétique (0,17 M) et du chitosane extrait obtenues par CHENNI.A. il a été noté que la chitine n'a pas été dissoute dans la solution d'acide acétique même après une longue durée (24 h) par contre la dissolution totale du chitosane extrait dans la solution de l'acide acétique après 10 minutes d'agitation a été remarqué. Dans le cas de la chitine sa faible solubilité est attribuée à sa structure semi-cristalline avec des liaisons hydrogènes étendues, la densité énergétique cohésive (le paramètre de solubilité) sera très élevée ce qui fait que la chitine est insoluble dans tous les solvants classiques, sa densité de charge qu'est liée directement à son degré d'acétylation (DA%) implique son caractère hydrophobe.



**Figure II.12 :** Test de solubilité de la chitine extraite dans l'acide acétique 0.17M

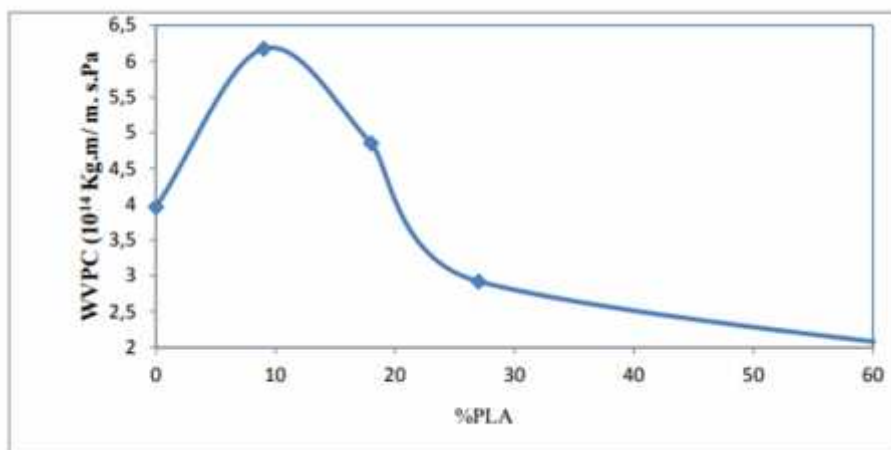


**Figure II.13 :** Test de solubilité du chitosane extrait dans l'acide acétique 0.17M

### II.2.3. Perméabilité a la vapeur d'eau (PVE) et vitesse de transmission de la vapeur d'eau (TRVE) :

Dans la première méthode utilisée par BEN DHIEB.F, Le chitosane a une forte perméabilité à la vapeur d'eau ( $3.95 \cdot 10^{-14} \text{kg.m. m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ ). L'ajout de polymères moins perméables comme le PLA ( $1.3 \cdot 10^{-14} \text{kg.m. m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ ) est supposé réduire cette perméabilité.

En augmentant la quantité de PLA dans le mélange Figure II.14, la perméabilité s'améliore, par rapport à celle du film de chitosane pur, à partir de 27% de PLA.



**Figure II.14 :** Perméabilité à la vapeur d'eau en fonction du % de PLA

Pour la perméabilité à la vapeur d'eau, il y a eu augmentation de la perméabilité pour le film avec 9% PLA, ce qui pourrait être expliqué par le fait que l'ajout d'une faible quantité de polymères désorganise la structure du chitosane et réduit ainsi sa cristallinité, or plus un polymère est cristallin moins il est perméable à la vapeur d'eau.

Pour des pourcentages plus élevés de PLA, la perméabilité est en nette diminution. Ce qui pourrait s'interpréter par le fait qu'à partir d'un certain pourcentage de polymères ajoutés au chitosane, la structure de la membrane devient plus compacte donc plus cristalline ou encore par le blocage de la diffusion des molécules d'eau et la diminution du gonflement de la matrice du polymère hydrophile, induite par les particules du polymère hydrophobe.

Concernant la deuxième méthode utilisée par CHENNI.A, la figure II.15 représente l'évolution du poids des gobelets des tests recouvert par des films de PLA vierge, PLA/ CHS 95/5, PLA/ CHS 90/10. Les courbes présentent des régimes différents, de 0 à 27 h une lente évolution a été observée suivie d'une augmentation plus rapide entre 45h et 216h. Les valeurs de transmission de la vapeur d'eau (TRVE) et le taux de perméabilité à la vapeur d'eau (PVE) sont enregistrés entre 45 et 117h pour chaque échantillon et résumés dans le tableau II.9

La forme de l'évolution du poids par rapport au temps est identique pour tous les échantillons. En fait, l'évolution de poids augmente rapidement avec le temps, les valeurs maximales sont enregistrées à 120 h d'exposition puis diminue lentement jusqu'à l'équilibre à 123h.

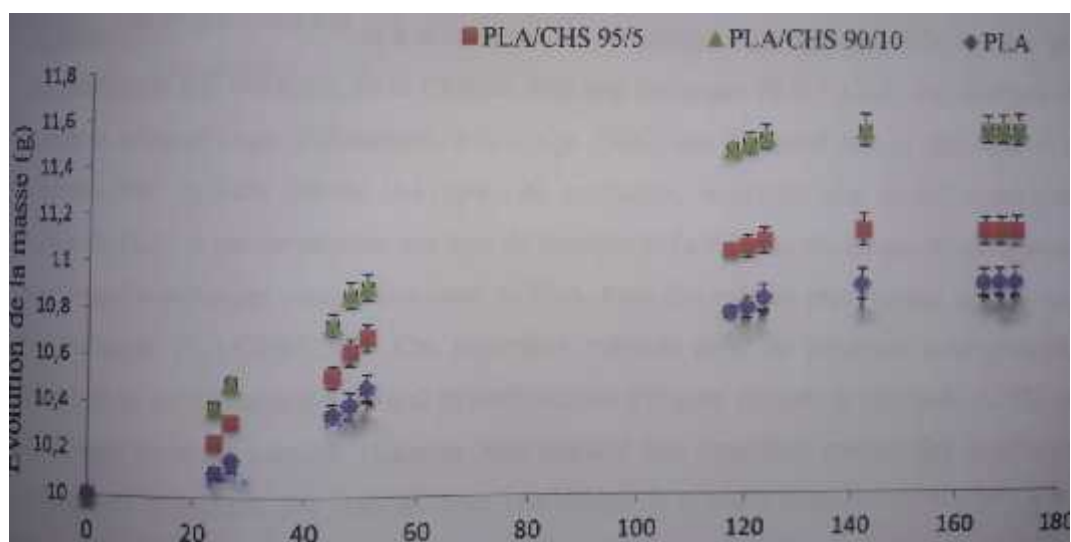
D'après la littérature, pour un polymère rigide, la transmission de la vapeur d'eau suit un mécanisme simple, en amont la vapeur d'eau imprègne le film par sorption sur la face de

## Chapitre II : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

diffusion, suivi par une dissolution dans l'épaisseur du film et établir rapidement l'équilibre, ensuite, en aval une diffusion à travers le film et une désorption à la face de sortie. Ce qu'explique que la TRVE des mélanges PLA/CHS a augmenté rapidement suivie d'un état d'équilibre.

En outre, nous pouvons dire que les TRVE et PVE augmentent avec l'augmentation du taux de chitosane dans le mélange et cette tendance est valide pendant toute la période d'exposition. D'après les valeurs du tableau II-9, l'incorporation du chitosane dans la matrice de PLA a fortement augmenté la PVE de PLA.

La PVE de PLA vierge est environ de  $7,71 \cdot 10^{-7}$  (g/Pa\*m\*h) et avec l'incorporation de 10% en poids de chitosane cette valeur augmente à  $20 \cdot 10^{-7}$  (g/Pa\*m\*h) et ceci est attribué à la nature hydrophile du chitosane.



**Figure II.15** : Evolution de la masse des gobelets de test couverts par des films de PLA, PLA/CHS 95/5%, PLA/CHS 90/10 %

**Tableau II-9** : Transmission de la vapeur d'eau (TRVE), Perméabilité à la Vapeur d'eau (PVE) du PLA vierge, mélange PLA/ CHS

Echantillons	Epaisseur des films (m)	TRVE (g*m <sup>-2</sup> *h <sup>-1</sup> )	PVE (g*Pa <sup>-1</sup> *m <sup>-1</sup> *h <sup>-1</sup> )
PLA	25*10 <sup>-5</sup>	4,32	7,71*10 <sup>-7</sup>
PLA/CHS (95/5%)	23*10 <sup>-5</sup>	10,37	17*10 <sup>-7</sup>
PLA/CHS (90/10%)	20*10 <sup>-5</sup>	14,33	20*10 <sup>-7</sup>

(Valeur mesurées entre t= 45h et 117h)

### II.2.4. Etude des propriétés antibactériennes du chitosane extrait :

L'objectif de cette partie est la discussion des résultats obtenus par CHENNI.A pour l'évaluation des propriétés antibactériennes du chitosane pur, PLA pur et des mélanges CHS/PLA.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) du chitosane extrait a été examinée à des concentrations de 0,1 à 1% contre 4 bactéries différentes incubées pendant 24h à 37°C. Comme le montre le tableau II.9. Le chitosane extrait a inhibé de façon efficace la croissance de la plus part des bactéries testées, cependant, l'effet inhibiteur du chitosane étudié varie selon le type de la souche bactérienne testée. Le chitosane a généralement montré des effets bactéricides plus forts contre les bactéries à gram-positif que contre les bactéries à gram-négatif, comme observé par Jeon et al [41] et No et al [42]. Les valeurs de la CMI du chitosane extrait variaient de 0,3 % à 0,8 %, sauf pour la bactérie pathogène d'origine alimentaire *Salmonelle typhimurium* (plus de 1%). Cette dernière était la souche bactérienne la plus résistante. Pour les bactéries à Gram négatif, le chitosane extrait s'est avéré plus efficace contre *E.coli* avec une CMI un peu élevée de 0,8% comparativement au *Salmonelle typhimurium* ou son activité antibactérienne été très faible ou nulle (> 1%). Ceci suggère que les souches gram-négatives sont plus résistantes aux agents antimicrobiens. Dans une étude similaire, Jeon et al ont rapporté que le chitosane à 0,06% (p/v) inhibait plus efficacement *E. coli* que *P. aeruginosa* (bactérie à gram-négatif), suggérant des sensibilités variables de différents microorganismes aux agents antimicrobiens. Ces résultats sont en accords avec ceux trouvés par Benhabiles et al [38], Helander et al [39].

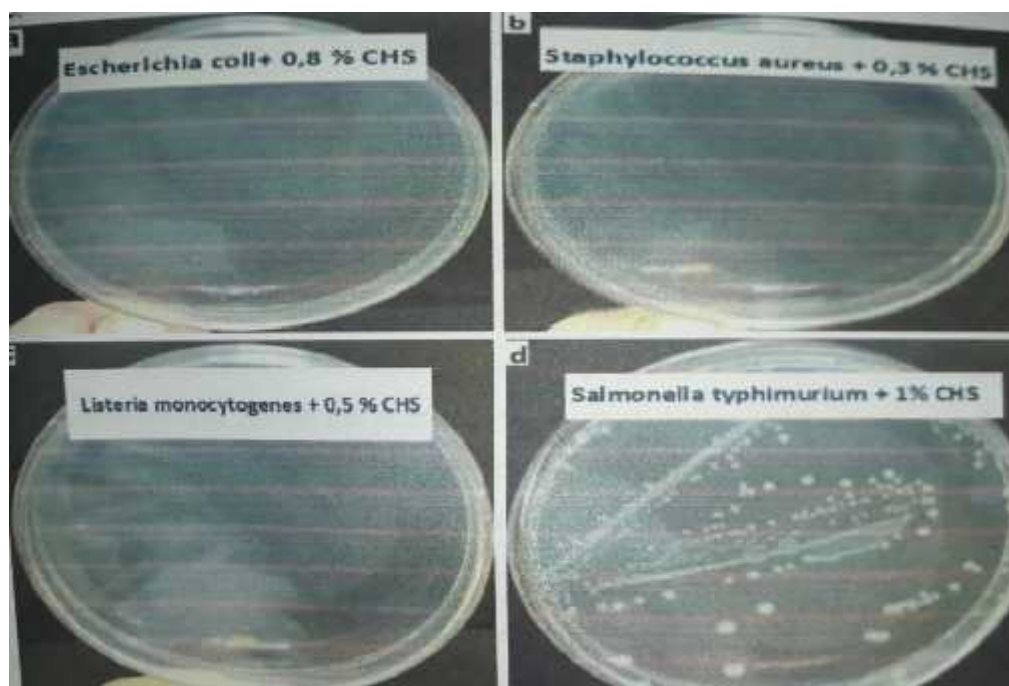
Les propriétés et la structure de la membrane cellulaire bactérienne jouent un rôle important dans l'activité antimicrobienne du chitosane. Les bactéries Gram-positives sont nettement plus sensibles à l'activité antimicrobienne du chitosane, par rapport aux bactéries Gram-négatives. Cette différence de sensibilité est largement attribuée aux différences structurales de leurs enveloppes cellulaires.

## Chapitre II : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

**Tableau II.10 :** Concentration minimale inhibitrice (CMI) en (%) du chitosane extrait contre quatre bactéries différentes.

Souches bactériennes	Présence d'une activité antibactérienne (- /+)	Concentration minimales inhibitrice(CMI) en (%)
Gram (-) (Escherichia coli )	+	0.8
Salmonella typhimurium	-	>1
Gram(+) (Listeria monocytogenes)	+	0.5
Staphylococcus aureus	+	0.3

Plusieurs chercheurs ont rapporté des résultats comparables à ceux trouvés dans cette étude. Tsai et Su [43], ont rapporté que le pH acide augmentait l'effet bactéricide du chitosane contre E. coli. Yun et al [44], ont noté que les CMI du chitosane étaient de 1,4 à 1,7 fois plus faibles à un pH de 3,6 à 3,8 qu'à un pH de 5,9 à 6,0. Wang [45] a trouvé que l'activité antibactérienne du chitosane contre cinq espèces pathogènes d'origine alimentaire (S.aureus, E. coli, Y. enterocolitica, L. monocytogenes, S. typhimurium) était plus forte à pH 5,5 qu'à pH 6,5. Ces résultats indiquent clairement que l'application de chitosane à des aliments acides améliorera son efficacité en tant que conservateur nature.



**Figure II.16:** test de dilution en milieu solide des CMI de chitosane contre (a) Escherichia Coli, (b) Staphylococcus aureus, (c) Listeria monocytogenes et (d) Salmonella typhimurium

### **II.2.4.1. Etude des propriétés antibactériennes des films à base de PLA chargés de chitosane:**

Les propriétés antibactériennes des films de PLA pur, chitosane pur, des mélanges de PLA /CHS (95/5,90/10,95/15 et 80/20 %) contre les souches examinées ont été étudié par CHENNI.A. Les films de PLA pur et chitosane pur ont été utilisés comme témoin.

Dans le cas des films de PLA pur, chitosane pur, aucune activité antibactérienne n'a été enregistrée contre toutes les souches bactériennes testées.

Les films PLA/CHS (95/5%, 90/10%) n'ont pas présenté une activité antibactérienne contre toutes les souches testées. en revanche, dans le cas des mélanges PLA/CHS (85% / 15%) de faible effet d'inhibition ont été enregistrés. Un cas exceptionnel a été observé pour la formulation PLA/CHS (80/20%) était contre la *salmonelle typhimarium*, la formation d'une zone d'inhibition a été observé autour du film indiquant une activité antibactérienne efficace.

## Conclusion générale

---

Ce présent travail s'inscrit dans le but de la valorisation de la biomasse et du développement des films à base de polymères biodégradables avec un caractère antibactérien pour une éventuelle application dans le domaine de l'emballage alimentaire, en premier lieu nous avons résumés les travaux effectués par CHENNI.A et BEN DHIEB.F afin d'étudié la caractérisation de la chitine et du chitosane extraits à partir des carapaces de crevettes récupérées au niveau local. Ensuite, l'étude des films obtenus à partir du chitosane et du PLA.

La chitine et le chitosane ont été extraits à partir des carapaces de crevette locale récupérée. L'extraction de la chitine et du chitosane a été effectuée par un prétraitement des carapaces de crevettes suivit d'un traitement acido-basique. Une solution de l'hydroxyde de sodium (2M) et de l'acide chlorhydrique (1M) ont été utilisées pour la déprotéinisation et la déminéralisation, tandis que l'hypochlorite de sodium (NaClO) a été utilisé pour la décoloration de la chitine. Le chitosane a été obtenu par désacétylation de la chitine extraite à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 12,5M. La chitine et le chitosane extraits ont été caractérisés par la teneur en cendre et en humidité, Infrarouge à transformation de Fourier (IRTF) et par un test de solubilité. Ces tests effectués nous ont permis d'avoir les résultats suivants :

Les structures chimiques de la chitine et du chitosane extraits ont été confirmées par la spectroscopie infrarouge. Leurs degrés de désacétylation (DD%) ont été calculés à partir des spectres IR, les valeurs du degré de désacétylation (DD%), de la chitine et du chitosane extraits sont de 24,27% et 78,48%, respectivement. Le chitosane a montré une solubilité complète dans une solution (0,17M) d'acide acétique tandis que la chitine extraite n'a pas été dissoute dans les mêmes conditions expérimentales.

Pour l'étude et l'évaluation des propriétés antibactériennes, le chitosane préparé dans cette étude a présenté de très bonnes propriétés antibactériennes par une inhibition totale de la croissance des souches *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* (bactéries à gram positif) à des très faibles concentrations (CMI 0,3% et 0,5%) comparés aux bactéries à gram négatifs ou le chitosane extrait a présenté de faible effet antibactérien, l'inhibition totale de la croissance de la souche *E.coli* a exigé une concentration élevée de (CMI 0,8%) pour la souche *Salmonella typhimurium* aucune activité antibactérienne ni enregistrée même à une concentration élevée (CMI 1%)

## Conclusion générale

---

D'après les résultats obtenus, le cas des films de PLA pur, chitosane pur, aucune activité antibactérienne n'a été enregistrée contre toutes les souches bactériennes testées. Pour les films PLA/CHS (95/5%,90/10%) aucune activité antibactérienne n'a été présentée contre les souches testées.

En revanche, dans le cas des mélanges PLA/CHS (85/15%) de faibles effets d'inhibition ont été enregistrés, il a été visible que les parties en contact avec le milieu de culture inhibaient la croissance des bactéries avec un effet faible, mais sur les milieux adjacents la croissance des bactéries était visible. Un cas exceptionnel a été observé pour la formulation PLA/CHS (80/20%) était contre la *Salmonella typhimurium* où il y a eu la formation d'une zone d'inhibition autour du film indiquant une activité antibactérienne efficace.

### **Perspectives :**

Incorporation du thym comme huile essentielle dans le chitosane extrait pour l'étude des propriétés antibactériennes de ce mélange et l'amélioration des propriétés anti-oxydantes.



- [1] PlasticsEurope, *Plastics – the Facts 2013*. An analysis of European latest plastics production, demand and waste data. *Plastics*.
- [2] Delphine Rutot, Philippe Dubois. 2004. « Les (bios) polymères biodégradables : l'enjeu de demain » *Chimie nouvelle*, pp.86.
- [3] Catherine Nettles Cutter. 2006. « Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods », *Meat Science* 74, pp.131–142. «»
- [4] B. R. E. Drumright, P. R. Gruber, and D. E. Henton, 2000 «*Polylactic Acid Technology*» vol. 48674, no. 23, pp. 1841-1846.
- [5] Sin, L. T., Rahmat, A. R., & Rahman, W. A. W. A. 2013 «*Polylactic acid: PLA biopolymer technology and applications* ». United Kingdom: Elsevier.
- [6] F. Shahidi, J. K. V. Arachchi, and Y. J. Jeon. 1999 «*Food applications of chitin and chitosans* » *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 10, no. 2, pp.37-51.
- [7] M.N. Ravi Kumar. 2000 «*A review of chitin and chitosane applications*» *React. Funct. Polym.*, vol. 46, no. 1, pp. 1-27.
- [8] C. Tual, E. Espuche, M. Escoubes, and A. Domard. 2000 «*Transport properties of chitosane membranes: influence of crosslinking*» *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 38, pp.1521-1529.
- [9] J. Hosokawa, M. Nishiyama, K. Yoshihara and T. Kubo. 1990. «*Biodegradable Film Derives from chitosane and Homogenized Cellulose* », *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 29, no.5, pp. 800-805.
- [10] B. L. Butler, P.J. Vergano, R. F. Testin, J. M. Bunn, and J. L. Wiles. 1996 «*Mechanical and Barrier Properties of Edible Chitosan Films as affected by Composition and Storage* » *J. Food Sci.*, vol. 61, no. 5, pp. 953-956.
- [11] V. Coma, A. J. Martial-Gros, S. Garreau, A. Copinet, F. Salin, and A. Deschamps. 2002, «*Edible Antimicrobial Films Based on Chitosan Matrix* » *J. Food Sci.*, vol. 67, no. 3, pp. 1162-1169.

- [12] J. Rhoades and S. Roller.2000, «Antimicrobial actions of degraded and native chitosane against spoilage organisms in laboratory media and foods » *Appl, Environ. Microbiol.*,vol. 66, no. 1, pp. 80-86.
- [13] S.Roller and N.Covill, 1999, «The antifungal properties of chitosane in laboratory media and apple juice » *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 47, no. 1-2, pp. 67-77.
- [14] H. Li and T. Yu.2001, «Effect of chitosane on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit » *J. sci. Food Agric.*, vol. 81, no. 2,pp. 269-274.
- [15] B. Ouattar, R. E. Simard, G. Pielt, A.Bégin, and R.A. Holley.2000, «Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosane » *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 62, no. 1-2, pp. 139-148.
- [16] Y.J. Jeon, J. Y. V. A. Kamil, and F.Shahidi.2002,«Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod » *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 18, pp. 5167-5178.
- [17] Duikom Noutsu, Carmen Pascale.2012. «Valorisation des fractions de la production d'éthanol de maïs en bioplastique » *Mémoire de maîtrise électronique, Montréal, Ecole de technologie supérieure* pp. 4-8.
- [18] A. Seyni. 2008. «Propriétés physico-chimiques et d'usage de matériau composite a charge dégradable produits par co-broyage» *Institut National Polytechnique de Toulouse, Thèse de doctorat.* pp. 21-23.
- [19] L. Sambha'A. 2011. «Contribution à l'étude de la structure et de la texture du PLA : Effet de la dégradation hydrothermale» *Université de Haute Alsace, Thèse de doctorat.*pp. 26-27.
- [20] H.L. Boudjema.2016. «Elaboration De Matériaux Composites Biodégradables Issus De Ressources Renouvelables» *Université D'oran 2. Thèse de Doctorat .* pp. 46
- [21] S. Solarski, M. Ferreira, and E. Devaux.2005.« Characterization of the thermal properties of PLA fibers by modulated differential scanning calorimetry »vol. 46, pp. 111871-11192.

- [22] Chenni Abdenour .2018. «Elaboration et caractérisation des composites et nanocomposites à base de Poly (acide lactique) chargés de chitosane et de la Cloisite®30B». Université A.MIRA-BEJAIA .Thèse de doctorat.. p. 76-220
- [23] S. Dimitriu.1998. « Polysaccharides. Structural Diversity And Functional Versatility», Marceldekker, Sherbrooke, Canada.
- [24] G. Glasserw, L. Sarkanens.1989. « Properties And Materials, American Chemical Society »,Washington,.
- [25] Godonb. 1996. «Valorisation non Alimentaire (Hors Biocarburants) Des Produits Agricoles» Académie Des Sciences-Cadas, Paris.
- [26] H.G. Fritz, T. Seidenstücker, U. Bölz, M. Juza.1994. « Study on production of thermoplastics and fibres based mainly on biological materials ». Science, Research And Development, Stuttgart .
- [27] BENALI A. 2013. «Préparation des composites argile-chitosane, application à la rétention des colorants » mémoire de master en chimie de l'université de Tlemcen,.
- [28] HASSAINIA, Abdelghani.2018. «Obtention du biopolymere «chitine» a partir du champignon «agaricus bisporus»: extraction et caracterisation». Thèse de doctorat. pp.10-11.
- [29] LE ROUX, Karine.2012. « Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevette *Penaeus vannamei*. Caractérisations des produits et optimisation du procédé ». Thèse de doctorat. Université de Nantes. pp.15 -29
- [30] Taouint Aissa Nadjia.2016. «Préparation de chitosane a partir de la biomasse marine. Application au conditionnement des boues urbaines ».Thèse de Magister. Université de Tizi-Ouzou.
- [31] 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.
- [32] ARAREM F. 2010. «Synthèse et caractérisation de biopolymères. Application au piégeage de colorants» Mémoire de magister de l'université d'Oran.
- [33] Ben Dhieb Fatima.2014. «Développement et caractérisation de films biodégradables a base d'acide poly lactique et de chitosane ».Université de Laval.

- [34] A. Baxter, M. Dillion, A. Taylor, and G. A. Roberts. 1992. «Improved method for IR determination of the degree of acetylation of chitosane » *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 14, pp. 166-169.
- [35] I. Younes, O. Ghorbel-Bellaaaj, R. Nasri, M. Chaabouni, M. Rinaudo, and M. Nasri. 2012. «Chitin and chitosane preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization » *Process Biochem.*, vol. 47, no. 12, pp. 2032-2039.
- [36] M. S. Rao, J. Munoz, and W. F. Stevens. 2000. «Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste » *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 54, no. 6, pp. 808-813.
- [37] M. S. Benhabiles et al. 2013. «Protein recovery by ultrafiltration during isolation of chitin from shrimp shells *Parapenaeus longirostris* » *Food Hydrocoll.*, vol. 32, no. 1, pp. 28-34.
- [38] M. T. Isa, A. O. Ameh, M. Tijjani, and K. K. Adama. 2012. « Extraction and characterization of chitin and chitosane from Nigerian shrimps » *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, vol. 6, no. 1, pp. 446-453.
- [39] S.-O. Fernandez-kim. 2004. «Physicochemical and function properties of crawfish chitosane as affected by different processing protocols » Louisiana State University and Agriculture and Mechanical College.
- [40] J. YJ., P. PJ., and K. SK. 2001. «Antimicrobial effect of chito-oligosachharides produced by bioreactor » *Carbohydr Polym*, vol. 44, pp. 71-76.
- [41] H. K. No, N. Y. Park, S. H. Lee, and S. P. Meyer. 2002. «Antibacterial activity of chitosans and chitosane oligomers with different molecular weights » *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 67, pp. 65-72.
- [42] I. M. Helander, E. L. Nurmiäho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, and S. Roller. 2001. «Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria » *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 71, no. 2-3, pp. 235-244.
- [43] G. Tsai and W. Su, 1999. «Antibacterial activity of shrimp chitosane against *Escherichia coli* » *J Food Prot*, vol. 62, pp. 239-243.
- [44] Y. S. Yun, K. S. Kim, and Y. N. Lee. 1999. «Antibacterial and antifungal effect of chitosane » *J. Chitin Chitosan*, vol. 4, pp. 8-14.

[45] G. H. Wang. 1992. «Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosane » J. Food Prot, vol. 55, pp. 916-919.

## **RÉSUMÉ**

De nos jours, l'emballage est un élément essentiel du commerce moderne des biens, ce qui garantit la préservation de la qualité des produits alimentaires. Les exigences en matière d'emballage destinée à entrer en contact avec les aliments sont systématiquement croissantes. En raison de l'intérêt croissant des consommateurs pour la consommation de produits frais avec une durée de conservation prolongée et une qualité contrôlée, les fabricants doivent fournir un emballage moderne et sûr. Les producteurs d'emballage cherchent donc des solutions qui permettent d'améliorer les propriétés des matériaux d'emballage.

Ce travail s'inscrit dans un contexte de valorisation de la biomasse et principalement de l'élaboration des composites à base de ressources renouvelables, dans une première étape nous nous sommes focalisés sur l'extraction et la caractérisation de la chitine et du chitosane à partir des carapaces de crevette par des traitements chimiques, suivie d'une deuxième étape qui consiste à élaborer des mélanges à base d'un biopolymère synthétique qui est le Polyacide lactique (PLA) chargé du chitosane extrait. Une troisième étape a pour objectif de plastifier le chitosane. Les matériaux élaborés dans ce travail ont été caractérisés par différentes méthodes et technique d'analyses.

D'après l'étude des propriétés antibactériennes des films à base de PLA chargés de chitosane, les mélanges préparés ont été testés contre plusieurs souches bactériennes, les mélanges PLA/CHS ont présenté de faibles propriétés antibactériennes, une inhibition de la croissance des souches bactériennes a été enregistrée pour les parties des films en contact avec le milieu de culture sauf pour la souche *Salmonella typhimurium* où la zone d'inhibition a été formée autour du coupon de la formulation PLA/CHS contenant 20% de chitosane.

## **ABSTRACT**

Nowadays, packaging is an essential element of modern trade in goods, which guarantees the preservation of the quality of food products. The requirements for packaging intended to come into contact with food are systematically increasing. Due to the growing consumer interest in consuming fresh products with an extended shelf life and controlled quality, manufacturers have to provide modern and safe packaging. Packaging producers are therefore looking for solutions to improve the properties of packaging materials.

This work takes place in a context of biomass valorization and mainly the elaboration of composites based on renewable resources. In a first step we focused on the extraction and characterization of chitin and chitosan from shrimp shells by chemical treatments, followed by a second step which consists in elaborating mixtures based on a synthetic biopolymer which is the Polylactic Acid (PLA) loaded with extracted chitosan. A third step aims to plasticize the chitosan. The materials elaborated in this work have been characterized by different methods and analysis techniques.

According to the study of the antibacterial properties of the chitosan loaded PLA films, the prepared mixtures were tested against several bacterial strains, the PLA/CHS mixtures showed weak antibacterial properties, an inhibition of the growth of the bacterial strains was recorded for the parts of the films in contact with the culture medium except for the *Salmonella typhimurium* strain where the inhibition zone was formed around the coupon of the PLA/CHS formulation containing 20% chitosan.