

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département Biochimie-Microbiologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master 2 en Biologie
Option : Biochimie Appliquée

Thème

*Optimisation de la désacétylation
chimique de la chitine par la
méthode de surfaces de réponses*

Présenté par : M^{elle} LABANI Nedjma et M^{elle} NAFA Sara

Soutenu le : 14/10/2015

Devant le jury composé de :

M ^r AMEROUCHE T.	Maître de conférences A	UMMTO	Président
M ^{me} TAZDAÏT R.	Maître de conférences B	UMMTO	Promotrice
M ^r TAZDAÏT D.	Maître de conférences B	UMMTO	Co-promoteur
M ^{me} IRATNI G.	Maître-Assistante A	UMMTO	Examinatrice
M ^{me} BENZAOUZ K.	Maître -Assistante A	UMMTO	Examinatrice

Année universitaire : 2014/2015

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions **DIEU**, le tout puissant, pour nous avoir donné la force, la volonté et la patience pour la réalisation de ce travail.

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à notre promotrice, Mme TAZDAÏT R., Maître de Conférences B à l'UMMTO, pour nous avoir guidées et encouragées pendant toute la durée de ce travail. Ses conseils, ses orientations, sa sagesse, sa rigueur scientifique, sa confiance en nous et ses efforts fournis au cours de la rédaction de ce mémoire nous ont permis de mener à bien ce travail.

Nous tenons à présenter également nos remerciements à notre Co-promoteur Mr TAZDAÏT D., Maître de Conférences B à l'UMMTO pour son aide, ses orientations et ses conseils judicieux.

Nous exprimons nos vifs remerciements à Mr AMEROUICHE T., Maître de Conférences A à l'UMMTO, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Nos remerciements les plus chaleureux à Mme IRATNI G., Maître-assistante A à l'UMMTO, pour l'attention qu'elle a portée à ce mémoire en acceptant de l'examiner.

Nous tenons à remercier également Mme BEN AZZOUZ K., Maître-assistante A à l'UMMTO, pour le temps qu'elle a consacré pour évaluer ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à l'ensemble des ingénieurs et personnels du laboratoire commun II de l'UMMTO pour nous avoir aidées et orientées pendant nos expérimentations.

Nous tenons à remercier :

- Mme LOUNI D, professeur de chimie à l'UMMTO,
- Mr MAMOU, Chef du département de pharmacie de la faculté de Médecine de l'UMMTO,
- Mr BEN AKMOUM, Chef du département de la faculté de l'ingénieur de l'université de M'hamed Bouguera de Boumerdès,
- Mr AKKOUCHE, Responsable du Laboratoire FTIR du département de chimie et hydrocarbure de l'université de M'hamed Bouguera de Boumerdès,
- L'ensemble des professeurs du département de chimie de l'université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediène d'Alger,

Pour nous avoir orientées et accueillies chaleureusement dans leurs laboratoires et aidées pour la réalisation de nos analyses.

Enfin, nos remerciements s'adressent à tout ceux qui ont contribué et orientés de près ou de loin pour la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

C'est avec grand plaisir que je dédie ce modeste travail a ceux qui m'ont toujours soutenues , encouragés, aidés et été la cause de ma réussite pendant toute mon parcours scolaire et universitaire : a ma chère mère et mon chère père , que dieu les garde et les bénie.

Je dédie ce travail a ma chère famille : ma grand mère, mes frères, ma tante et ces enfants pour leurs soutien et aide précieuse.

Je dédie ce travail à Ouardia et yasmîna, houria pour leurs aides précieuses qui m'ont faite.

Sans oublier mes camarades et mes amies de notre promo biochimie 2015.

À Toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont apporté leur aide, à tous, du fond de mon cœur je vous dédie ce travail.

Toute en espérant que sa sera pas mon dernier travail toujours dans ce domaine pertinent et passionnant de biochimie.

Nedjma

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail,

À la mémoire de mon cher Père.

À ma très chère Mère qui m'a vraiment soutenue et encouragée, que DIEU la protège.

À mes trois frères adorés : Mara, Ishak et Okba.

À ma petite sœur adorée Selma.

À mon grand-père et son épouse nana Tassadit.

À mon oncle Mohamed, son épouse tata Fariza et mes chers cousins : Younes, Sid ali et Abd rahim.

À Dalila Louni et sa maman khalti Ouiza.

À ma meilleure et chère amie depuis l'enfance Samia, son mari Abdennour et ses enfants Manel et Abdelhak.

À ma très chère amie Sekoura avec qui j'ai partagé de très bons moments à l'université.

À mon amie Nadia et sa fille Chaïma.

À mon amie Hayet et sa fille Chaïma.

À mes amies : Samira, Farida, Lamia, Souad, Souhila, Hassina, Lynda, Nadia, Radia, Hayet, Kamelia, Thiziri, Fariza et Lydia.

À ma voisine Anissa, que je considère comme ma grande sœur.

À tous mes camarades du Master en Biochimie Appliquée.

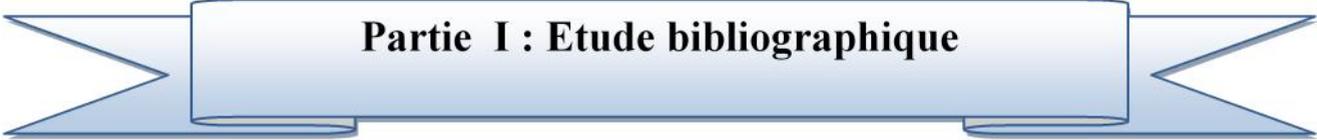
À ma camarade Nedjma, avec qui j'ai partagé ce travail.

À toute personne qui a été présente dans ma vie, qui m'a soutenue et qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Sara

SOMMAIRE

Liste des abréviations	I
Liste des figures.....	II
Liste des tableaux.....	III
Introduction générale.....	01



Partie I : Etude bibliographique

Chapitre 1: Généralités sur la chitine et le chitosane

1-1-Définition	02
1-2-Historique	02
1-3-Ressources naturelles de chitine et chitosane	02
1-4- Structure chimique de la chitine et du chitosane	03
1-5-Biosynthèse de la chitine et du chitosane.....	05
1-6-Organisation de la cuticule chez les crustacés	07
1-7- Propriétés de la chitine et du chitosane	09
1-7-1- Propriétés de la chitine.....	09
1-7-2-Propriétés du chitosane.....	10
1-8-Obtention de la chitine et du chitosane.....	12
1-8-1-Obtention de la chitine	12
1-8-1-1-Voie chimique.....	12
1-8-1-2-Voie biologique	12
1-8-2- Obtention du chitosane	13
1-8-2-1- Voie chimique	13
1-8-2-2- Voie enzymatique	14
1-9-Les applications de la chitine et du chitosane	14

Chapitre 2 : les plans d'expérience

2-1-Introduction	17
2-2-Définition	17
2-3-Modélisation	18
2-3-1-Facteurs, niveaux et réponses	18
2-3-2-Modèle	18
2-3-2-1- Définition..... ;	18
2-3-2-2- Les modèles.....	18
2-3-2-2-1-Modèle affine sans interactions.....	18
2-3-2-2-2- Modèle affine avec interactions doubles.....	19
2-3-2-2-3-Modèle affine avec interactions d'ordre supérieur	19
2-4-Les catégories des plans d'expériences	19
2-4-1-Les plans réduits	19
2-4-2-Les plans complets.....	19
2-4-2-1-La Méthode des surfaces de réponses.....	20
2-4-2-1-1-Définition.....	20
2-4-2-1-2- Les Modèles de surface de réponse.....	20
2-4-2-1-2-Représentation graphique.....	22



Partie II : Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériel et Méthodes

1-Matériel.....	24
1-1-Matériel biologique.....	24
1-2-Matériel chimique.....	24
1-2-1-Solutions et produits utilisés	24
1-2-2-Le petit matériel	24

1-3-Appareillage	24
2-Méthodes	25
2-1-Prétraitement des carapaces	25
2-2-Extraction de la chitine	25
2-2-1-Etape de déminéralisation.....	25
2-2-2-Etape de déprotéinisation	26
2-3-Optimisation de la désacétylation de la chitine.....	26
2-4-Caractérisation des produits obtenus	27
2-4-1-Détermination du degré de désacétylation	27
2-4-1-1-Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	27
2-4-1-1-1-Principe.....	28
2-4-1-1-2-Méthode.....	28
3-4-2--Etude de la cristallinité	29
3-3-2-1-Analyse par diffraction des rayons X	29
3-4-Détermination des paramètres optimaux de la désacétylation de la chitine	30
3-4-1- Application de la méthode de surfaces de réponses	30

Chapitre 2 : Résultats et discussion

1- Caractérisation de la chitine avant et après désacétylation.....	32
1-1-Caractérisation par FTIR	32
1-1-1-Caractérisation par FTIR de la chitine extraite des carapaces.....	32
1-1-2-Caractérisation par FTIR des échantillons de chitine désacétylée	33
1-2-Caractérisation par diffraction aux rayons X de certains échantillons de chitine désacétylée	34
1-3-Calculs des degrés de désacétylation	35
1-4-Analyse des résultats par la méthode de surfaces de réponses	36
1-4-1- Réponse obtenue (DD%).....	36
1-4-2-Analyse statistique.....	36

1-4-3- Modélisation de la désacétylation de la chitine	38
1-4-4-Interprétation des représentations graphiques obtenues par la méthode de surfaces de réponses	40
1-4-4-1-Variation du DD en fonction de la concentration en NaOH et du temps d'incubation.....	41
1-4-4-2-Variation du DD en fonction de la concentration en NaOH et de la température d'incubation.....	41
1-4-4-3-Variation du DD en fonction du temps et de la température d'incubation.....	42
1-5- Optimisation de la désacétylation de la chitine.....	43
Conclusion	45
Références bibliographiques	46
Annexes	56

Liste des abréviations

Acétyl-COA : Acétyl Coenzyme A

AGM: N-Acétyl Glucosamine Phosphate Mutase

COASH: Coenzyme A

CS : Chitine Synthase

DA : degré d'acétylation

DD : degré de désacétylation

DMAc : N, N DiMéthylAcétamide

FTIR : Fourier Transform InfraRed Spectroscopy (Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier)

G-FAT : Glutamine –Fructose-6-phosphate Amino Transférase

Glu-6-P : Glucose-6-Phosphate

GNA : Glucosamine-6-phosphate N-Acetyltransférase

L : Linéaire

pH : potentiel hydrogène

PM : Poids Moléculaire

Q : Quadratique

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

UAP : Uridine diphosphate N-Acetylglucosamine Pyrophosphorylase

UDP : Uridine Di-Phosphate

UDP-GlnNac : Uridine Di-Phosphate N-acétyl Glucosamine

UTP : Uridine TriPhosphate

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structures de la cellulose (a), la chitine (b) et du chitosane (c).....	04
Figure 2 : Biosynthèse <i>de novo</i> de la chitine chez les insectes.....	05
Figure 3 : Modèle structural de la chitine synthétase.....	06
Figure 4 : Réaction de désacétylation de la chitine en chitosane par la chitine désacétylase...06	
Figure 5 : Arrangement des trois formes de chitine (α , β , γ).....	07
Figure 6 : Niveaux hiérarchiques dans l'organisation de la cuticule du crabe <i>Homarus americanus</i>	08
Figure 7 : Quelques exemples de conditionnements du chitosane	11
Figure 8 : Plan de type poupées russes.....	21
Figure 9 : Expérimentation séquentielles.....	21
Figure 10 : Carapaces de crevettes rouges (royales) crevettes rouges <i>Aristeus antennatus</i> (RISSO, 1816).....	24
Figure 11 : Carapaces de crevettes avant (a) et après broyage (b).....	25
Figure 12 : Spectrophotomètre FTIR (Brucker alpha).....	28
Figure 13 : Diffractomètre de poudres (Philips PWO4 XPert pro x-ray).....	29
Figure 14 : Spectre infrarouge de la chitine extraite des carapaces de la crevette rouge.....	33
Figure 15 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°1.....	34
Figure 16 : Spectre de diffraction aux rayons X du produit de l'expérience N°1.....	35
Figure 17 : Diagramme de PARETO des effets standardisés des facteurs étudiés sur le DD	39
Figure 18 : Courbe de l'évolution du DD en fonction de la concentration en NaOH et du temps d'incubation.....	41
Figure 19 : Courbe de l'évolution du DD en fonction de la concentration en NaOH et de la température d'incubation.....	42
Figure 20 : Courbe de l'évolution du DD en fonction du temps et de la température d'incubation.....	42
Figure 21 : Chitine avant désacétylation.....	43
Figure 22 : Chitosane optimisé.....	43

Figure 23 : Spectre FTIR du chitosane optimisé.....	44
Figure 24 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°2.....	56
Figure 25 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°3.....	56
Figure 26 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°4.....	57
Figure 27 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°5	57
Figure 28 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°6.....	58
Figure 29 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°7	58
Figure 30 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°8.....	59
Figure 31 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°9.....	59
Figure 32 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°10	60
Figure 33 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°11.....	60
Figure 34 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°12	61
Figure 35 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°13.....	61
Figure 36 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°14	62
Figure 37 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°15.....	62
Figure 38 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°16.....	63
Figure 39 : Spectre de diffraction du produit de l'expérience N°2.....	64
Figure 40 : Spectre de diffraction du produit de l'expérience N°3.....	64
Figure 41 : Spectre de diffraction du produit de l'expérience N°4.....	65
Figure 42 : Spectre de diffraction du produit de l'expérience N°5.....	65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Sources naturelles potentielles de chitine	03
Tableau II : Quelques exemples de microorganismes fermentaires utilisés pour l'extraction de la chitine.....	13
Tableau III : Enzymes utilisées pour l'extraction de la chitine	13
Tableau IV : Quelques applications de la chitine.....	15
Tableau V : Quelques applications du chitosane.....	16
Tableau VI : Matrice de surfaces de réponses utilisée pour la désacétylation de la chitine.....	27
Tableau VII : Valeurs réelles et codées de la matrice utilisée.....	31
Tableau VIII : Résultats obtenus après calcul des DD par la méthode de Domszy et Roberts (1985).....	36
Tableau IX : Résultats de l'analyse statistique des effets des facteurs sur le degré de désacétylation de la crevette rouge <i>Aristeus antennatus</i> (RISSO, 1816).....	37
Tableau X : Résultats du calcul du DD de l'échantillon obtenu avec les paramètres optimaux.....	44
Tableau XI : Corrélation dans le moyen infrarouge entre structure et vibration ν en fonction de nombre d'onde (cm^{-1}).....	66
Tableau XII : Table de la loi de student	67



Introduction générale

Introduction générale

L'activité humaine, et plus spécifiquement industrielle, a été longtemps considérée comme étant à l'origine de la crise mondialisée de l'environnement. En effet, elle demeure la principale cause de la dégradation de l'écosystème. La filière halieutique prend sa part dans cette incrimination, avec l'évolution du marché mondiale des produits marins destinés à l'alimentation humaine ; la consommation représentait 7,8 kg par habitant en 2008 et a atteint 17,8 Kg par habitant en 2010 (FAO, 2014). Cette consommation est inégalement répartie sur la surface de la planète. La consommation de crustacés étant de 1,7 kg par habitant en 2010 (FAO, 2014). La production annuelle de crevettes était estimée à plus de 4,1 millions de tonnes en 2010 (FAO, 2012). En absence de données statistiques dévoilant la consommation, dans notre pays, des crustacés et en particulier les crevettes, l'impact de leurs effluents sur notre environnement proche reste sombre et la possibilité de valoriser leurs coproduits reste à planifier, mais à l'échelle internationale cette initiative a été prise avec une très grande considération.

Cette grande consommation mondiale de crustacés incite à réfléchir sur leurs équivalences en matières de coproduits et d'effluents qui résulte de cette exploitation et leurs effets sur le milieu environnant.

En effet, c'est en essayant de faire face aux conséquences désastreuses qui pourraient résulter d'un tel usage, que de nombreux progrès techniques ont connu le jour. En effet, certains de ces déchets ont dévoilés une grande importance que la biotechnologie peut matérialiser par transformation pour donner naissance à des produits utiles et commercialisables.

Les coproduits (tête et carapace) issus de crevettes sont riches en composés pouvant être récupérable (minéraux, protéines, lipides, chitine). La chitine, qui représente 17 à 33% des coproduits, peut être transformée en chitosane, composé à grande valeur commerciale.

L'objectif de cette étude est d'optimiser la préparation du chitosane, principal dérivé de la chitine, ayant d'innombrables applications dans divers domaines. Cette optimisation est réalisée en ayant recours à un plan d'expérience de type méthode de surfaces de réponses, tout en utilisant des conditions douces pour le traitement des carapaces afin d'obtenir, d'une part, un chitosane de haut degré de désacétylation, et d'autres part, une préservation écologique par le biais de la valorisation des déchets et l'utilisation minimale des réactifs chimiques.

Partie I :

Etude

bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur la chitine et le chitosane

1-1-Définition

La chitine est un polysaccharide aminé dont la nomenclature officielle est poly (N-acétyl-D-glucosamine) (Mignotte *et al.*, 2012). Le terme chitine vient du grec ancien *khitôn*, qui signifie tunique ou enveloppe, car c'est un constituant de l'enveloppe extérieure de nombreux organismes. C'est, après la cellulose, le polysaccharide le plus répandu dans la nature (Rinaudo, 2006). Le chitosane est le dérivé désacétylé de la chitine.

1-2-Historique

La chitine a été isolée, pour la première fois, en 1811 par Henri Braconnot qui a isolé un résidu impur à partir de parois cellulaires de champignons (Le roux, 2012). Il a remarqué que cette substance fibreuse n'est pas soluble dans les solutions aqueuses acides (Mokrani, 2013).

Le chitosane a été découvert, en 1859, par Charles Rouget qui a soumis la chitine à un traitement alcalin et a observé son comportement. La substance obtenue par ce traitement alcalin, a pu être dissoute dans les acides. En 1894, cette substance a été nommée chitosane par Hoppe–Seyler (Nugraha, 2006). Ce n'est qu'à partir des années 1970 que ces polymères ont suscité un réel intérêt en raison notamment des grandes quantités de déchets produits par les conserveries de crustacés.

1-3-Ressources naturelles de chitine et chitosane

Les ressources naturelles de chitine sont diverses (tableau I); elle est présente principalement dans les coquilles de mollusques, dans la cuticule des insectes, dans l'exosquelette des arthropodes (carapaces de crustacés) et dans l'endosquelette des céphalopodes (calmars). Ce polymère se trouve également dans la paroi de la plupart des champignons et dans certaines algues chlorophycées, levures et bactéries.

Associée à des protéines, la chitine contribue à la cohésion des différentes couches qui constituent la coquille de mollusques ou la carapace des arthropodes. En plus de son rôle dans le maintien de la rigidité cellulaire, elle contribue aussi au maintien de la pression osmotique (Tolaimate *et al.*, 2003).

Bien que les ressources potentielles de la chitine soient très nombreuses, sa principale source exploitée commercialement demeure les carapaces d'invertébrés marins qui sont des

sous-produits de la transformation alimentaire des crustacés, car pour ces industries, c'est une forme de revalorisation de la biomasse.

Des champignons (*Mucor rouxii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus phoenisis*) sont aussi utilisés, par les industries de fermentations, comme étant une deuxième source de chitine exploitée commercialement (Shahidi et Abouzaytoun, 2005).

Tableau I : Sources naturelles potentielles de chitine (Tolaimate *et al.*, 2003).

Source de chitine	Teneur en chitine (%)
Crabe marbré (<i>Grapsus marmoratus</i>)	10
Crabe rouge (<i>Portunus puber</i>)	10
Crabe araignée (<i>Maia squinada</i>)	16
Homard sautrelle (<i>Scyllarus arctus</i>)	25
Langouste (<i>Palinurus vulgarisrus</i>)	32
Crevette (<i>Palaemon fabricius</i>)	44
Seiche (<i>Sepia officinalis</i>)	20
Calmar (<i>Loligo vulgaris</i>)	40
Champignon (<i>Mucor rouxii</i>)	9,4
Champignon (<i>Aspergillus niger</i>)	42
Champignon (<i>Aspergillus phoenisis</i>)	23,7

Le chitosane est une substance peu répandue dans la nature, son existence tel quel est rare sauf dans le cas de certaines mycètes ; il est présent dans la paroi cellulaire de certains micro-organismes fongiques (champignons zygomycètes) et dans le mycélium de *Mucor rouxii*, *Rhizopusoryzae* et *Absidiacoerulea*. Il n'est signalé que dans les exosquelettes de certains insectes telle que la paroi abdominale des reines termites (Crini *et al.*, 2009).

1-4- Structure chimique de la chitine et du chitosane

La chitine est un polysaccharide linéaire formé d'unités N-acétyl-D-glucosamine liées par des liaisons glycosidiques de type $\beta 1 \rightarrow 4$. Très proche de la cellulose, elle se différencie par la présence du groupement acétylamine en position-2 (Figure 1) dans la chitine qui remplace le groupement alcool retrouvé dans la cellulose (Duval et Olivier, 2008).

La chitine n'a pas une structure chimique unique mais plusieurs ; elle englobe plusieurs polysaccharides composés d'unités N-acétyl-D-glucosamine (de 50 à 100%) et

d'unités D-glucosamine (de 0 à 50%). À l'inverse, lorsque le nombre d'unités D-glucosamine augmente (de 50 à 100%), le polymère devient soluble dans les solutions acides diluées et est nommé chitosane.

Le degré d'acétylation (DA) est un paramètre fondamental qui influence les propriétés des biopolymères chitineux. Il est défini comme étant le nombre d'unités de glucopyranose de la chaîne de biopolymère ayant un groupement N-acétyl (Khor, 2001). Il peut être déterminé par plusieurs techniques telles que la spectroscopie UV-visible et infrarouge, la spectroscopie par résonance magnétique, la potentiométrie, l'analyse élémentaire et la diffraction aux rayons X (Kasaai, 2009).

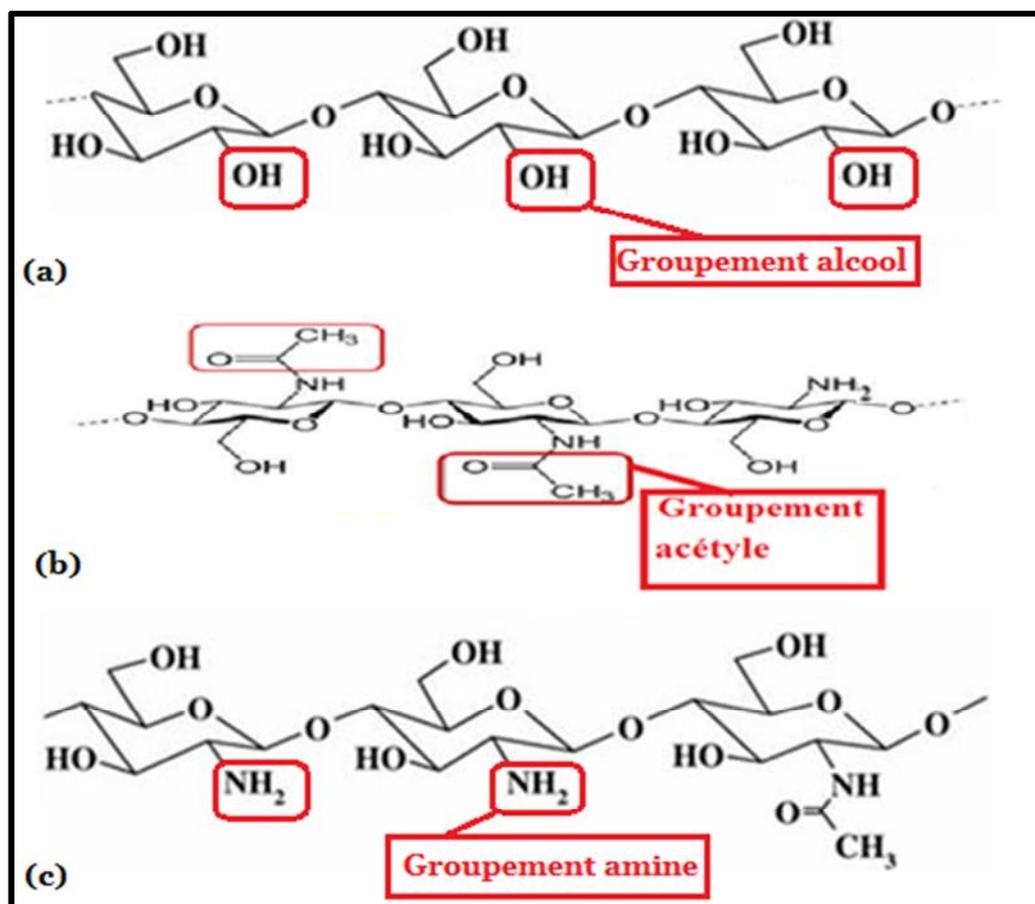


Figure 1 : Structures de la cellulose (a), la chitine (b) et du chitosane (c) (Bouquelet, 2008 ; Ifrimer, 2010).

Les macromolécules de chitine possèdent un poids moléculaire important, généralement supérieur à 10^6 Da, soit plus de 3000 à 5000 unités répétitives. Le chitosane, quant à lui, subit une réduction du poids moléculaire au cours de la désacétylation ; il est de l'ordre de 5×10^3 à 10^5 Da.

1-5-Biosynthèse de la chitine et du chitosane

La biosynthèse de la chitine (Figure 2) semble se dérouler d'une manière analogue chez les insectes, champignons et crustacés (Desbrieres, 2002). Elle fait intervenir des enzymes nommées chitine-synthétases (CS), de la famille des glycotransférases. Ces enzymes catalysent l'association de deux monomères de N-acétylglucosamines.

La biosynthèse est divisée en trois étapes distinctes. Au cours de la première étape, l'enzyme se place le long de la membrane cytoplasmique et oriente convenablement le polymère vis-à-vis de son site actif. La seconde étape est la translocation du polymère à travers la membrane (Figure 3). Il est alors libéré dans l'espace extracellulaire. La dernière étape permet l'assemblage de plusieurs polymères en microfibrilles cristallines (Le roux, 2012).

L'obtention d'une chitine cristalline exige donc la mise en place de deux réactions différentes, une polymérisation par transfert glucidique séquentiel, et un assemblage des chaînes de chitine, au cours duquel les chaînes s'associent du côté extra-cytoplasmique pour former de la chitine α , β ou γ (Merzendorfer, 2006).

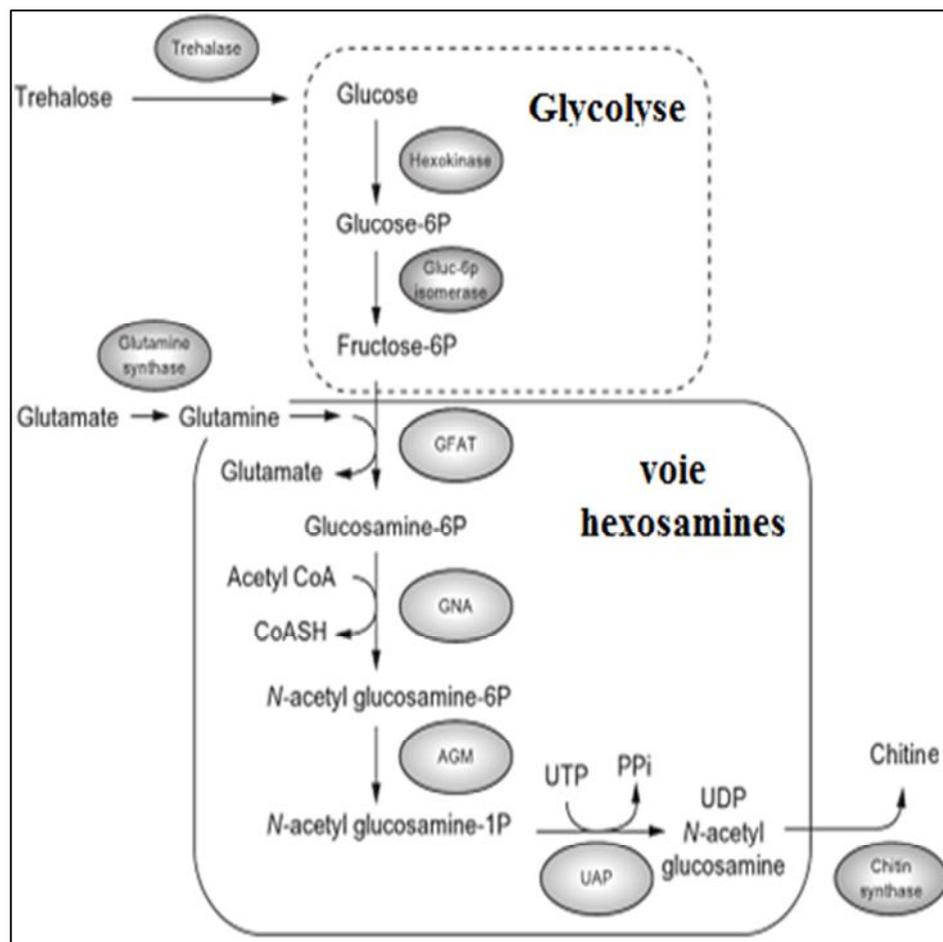


Figure 2 : Biosynthèse *de novo* de la chitine chez les insectes (Dhadialla, 2012).

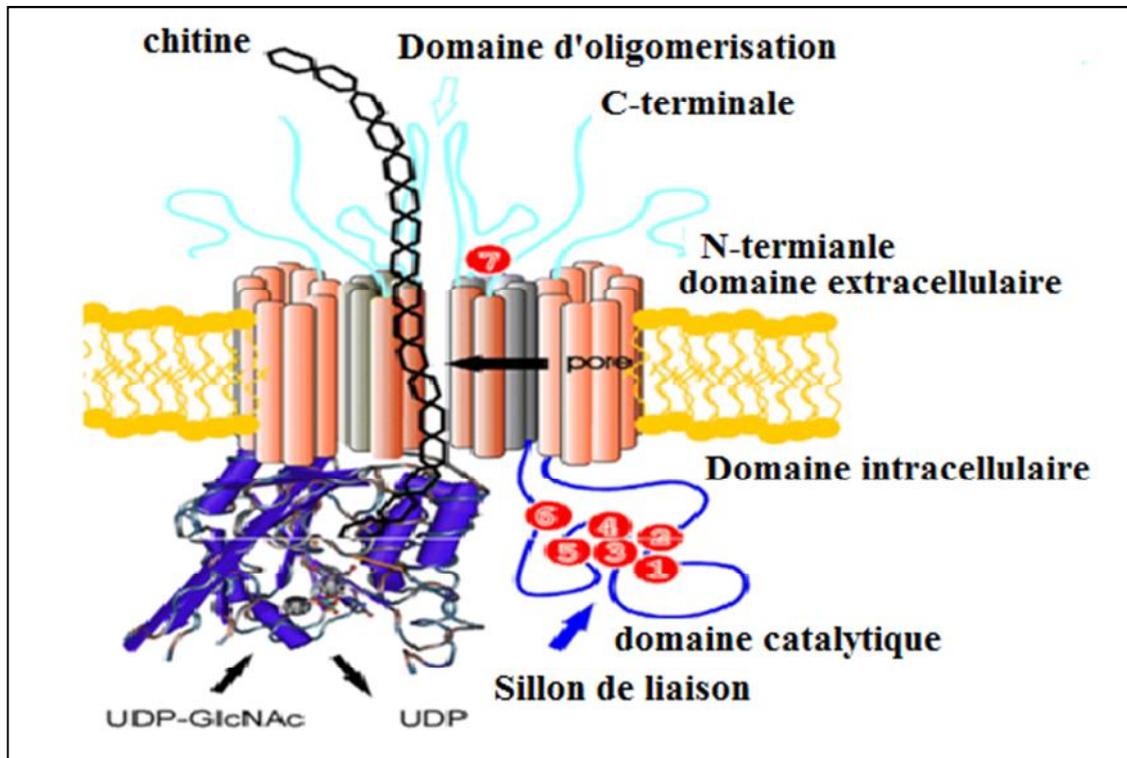


Figure 3 : Modèle structural de la chitine synthétase (Merzendorfer, 2006).

La biosynthèse du chitosane s'effectue de la même manière chez les crustacés, champignons et insectes, elle est assurée principalement par deux enzymes et s'effectue en deux étapes :

- la biosynthèse de la chitine par la chitine synthétase ;
- la désacétylation de la chitine (figure 4) par la chitine désacétylase (Le Nardon *et al.*, 2010).

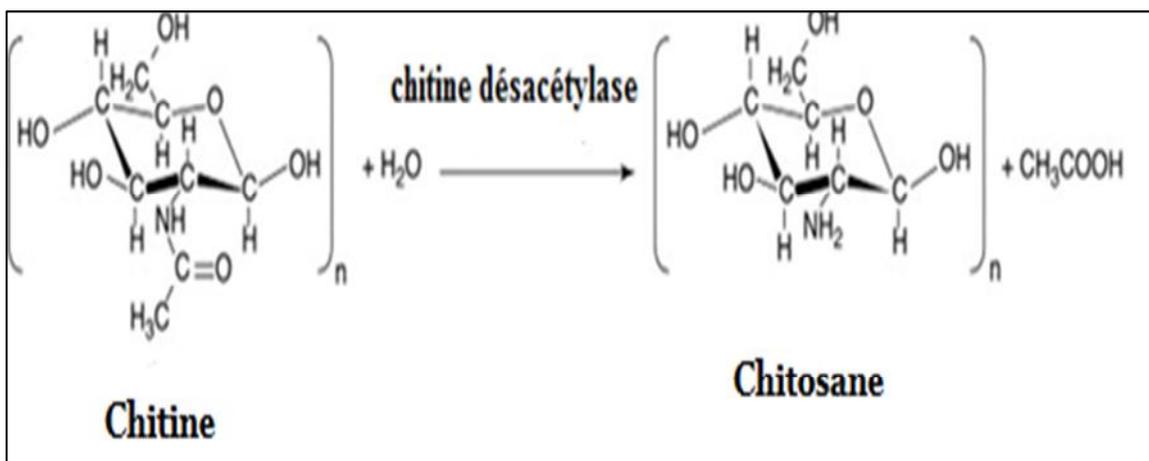


Figure 4 : Réaction de désacétylation de la chitine en chitosane par la chitine désacétylase (Tsigos *et al.*, 2000).

1-6-Organisation de la cuticule chez les crustacés

L'organisation de la structure de la cuticule a été décrite pour la première fois par Yves Bouligand (1972) dont le motif de la structure porte son nom. Cette dernière s'organise en plusieurs niveaux.

Au premier niveau se trouve la structure moléculaire de la chaîne linéaire polysaccharidique de la chitine. Au second, on distingue les trois formes d'arrangement géométrique de ces chaînes, soit α , β ou γ . Au troisième niveau, 18 à 25 molécules de chitine s'assemblent en unités cristallines, étroites et longues, enveloppées de protéines.

La chitine α (figure 5) représente la forme la plus abondante chez les crustacés, la plus stable et la plus répandue dans la nature. Elle est constituée par des molécules alignées formant des chaînes antiparallèles. Cet arrangement, confère à la chitine α une structure cristalline rigide avec de fortes liaisons hydrogènes donnant des propriétés physiques telles que une rigidité et résistance mécanique du biopolymère. Cette forme est retrouvée chez les mollusques, les crustacés, les épines des diatomées et des calmars et dans la paroi fongique (Khor, 2001; Kurita, 2001; Rinando, 2006).

La forme β représente la forme la moins stable et la plus biodégradable (Manisara *et al.*, 2003). Retrouvée dans la paroi intestinale des calmars, elle a un arrangement parallèle engendrant de faibles forces intermoléculaires, ce qui diminue sa stabilité, comparativement à la forme α (Lavall *et al.*, 2007).

La troisième forme polymorphique γ est peu courante (Rinaudo, 2008), on la trouve chez les cocons des coléoptères et l'estomac des Loligos (genre de calmar) (Kaplan, 1998). Elle est constituée de chaînes liées de manière parallèle et d'autres liées de manière antiparallèle (Ramirez-Coutiño *et al.*, 2006).

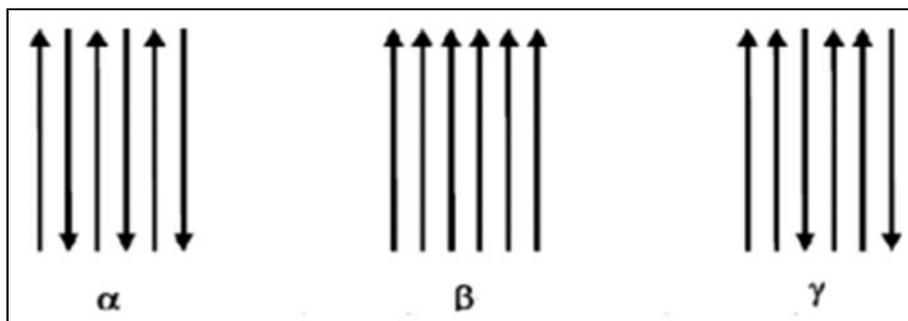


Figure 5 : Arrangement des trois formes de chitine (α , β , γ) (Einbu et Varum, 2007).

L'espace disponible entre les fibrilles est comblé par des protéines et des minéraux, principalement le carbonate de calcium, soit sous forme cristalline (calcite), soit amorphe. Les niveaux hiérarchiques dans l'organisation de la cuticule du crabe *Homarus americanus* sont représentés dans la figure 6 (Raabe *et al.*, 2005).

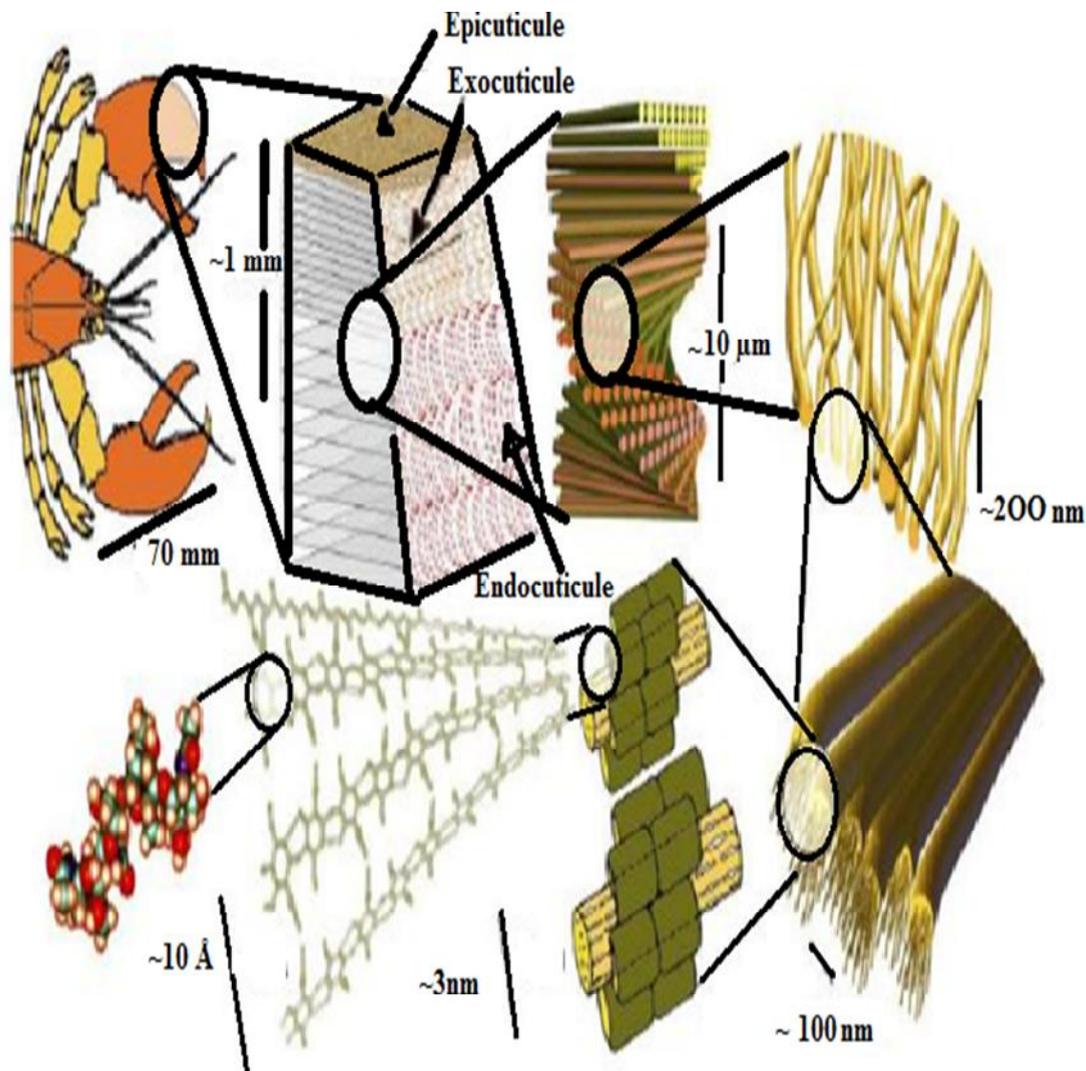


Figure 6: Niveaux hiérarchiques dans l'organisation de la cuticule du crabe *Homarus americanus* (Raabe *et al.*, 2005).

Par le biais de sa structure et de son organisation, la chitine joue plusieurs rôles structurels et fonctionnels vitaux. En effet, elle forme une barrière physique entre le corps et son environnement, et elle participe à sa protection contre les radiations, la chaleur, les agressions chimiques et physiques. Elle est également le site d'attachement des muscles et le lieu d'échange et de transport de substances, notamment l'adsorption de composés anioniques (Tokura et Tamura, 2007).

1-7- Propriétés de la chitine et du chitosane

La chitine et ses dérivés, principalement le chitosane, ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs et industriels depuis les années 1970 à cause de leurs propriétés physicochimiques et biologiques (Percot *et al.*, 2003; Kurita, 2006).

1-7-1- Propriétés de la chitine

La chitine est fortement hydrophobe et insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques (Di Mario *et al.*, 2007). C'est un polysaccharide azoté, basique, cationique, de couleur blanchâtre et non toxique (Morimoto *et al.*, 2002; Mrunal, 2004).

Les caractéristiques structurelles de la chitine et de ses dérivés déterminent directement leurs propriétés et par conséquent leurs domaines d'application (Lamarque *et al.*, 2004 ; De Alvarenga *et al.*, 2010). Leurs propriétés sont principalement liées au degré de polymérisation (correspond à la longueur de la chaîne, et donc sa masse molaire), au degré d'acétylation (DA) (ou de désacétylation DD), à la répartition des groupes acétyles et à la cristallinité (Jaworska *et al.*, 2003).

La chitine est insoluble dans les solvants usuellement utilisés pour la cellulose (solutions aqueuses d'hydroxyde de cuprammonium et de cupriéthylènediamine) (Poirier, 2000). Cette faible affinité pour les solvants est due aux fortes liaisons hydrogènes intermoléculaires (Kurita, 2001).

Généralement, la chitine (α - chitine) est soluble dans quelques solvants comme le N,N diméthylacétamide (DMAc) qui contient 5 à 10% de LiCl, et quelques solvants fluorés comme hexafluoroacétone et hexafluoro- 2- propanol (Yang *et al.*, 2004).

La chitine n'a aucun caractère antigénique, et de ce fait, est parfaitement compatible avec les tissus vivants. Son caractère antithrombogène et hémostatique confirme sa possibilité d'emploi dans tous les domaines de la biologie (Bal *et al.*, 2006 ; Majtan *et al.*, 2007).

La chitine est biodégradable; elle est hydrolysée par une série d'enzymes telles que les chitinases, le lysozyme et les glucanases (Patil *et al.*, 2000 ; Yang *et al.*, 2004). Les chitinases scindent la chitine en de nombreux points pour former principalement le chitobiose (disaccharide) et le chitotriose (trisaccharide). Une autre enzyme, la chitobiase, hydrolyse le chitobiose et le chitotriose en monomères qui peuvent être rapidement biodégradés (Jerome *et al.*, 2004).

1-7-2-Propriétés du chitosane

Le DD est l'une des propriétés les plus importantes du chitosane. Il influe sur les caractéristiques physiques et chimiques (Chatelet *et al.*, 2001).

Le chitosane est une substance semi-cristalline. Deux types de structures sont connus : le chitosane I (sous forme de sel) correspondant à un faible DD (60%). Il est plus désordonné que le chitosane II (forme amine libre) qui possède un fort DD (90%) (Hudson et Jenkins, 2003; Kurita, 2006).

Le chitosane est insoluble dans l'eau et dans les solutions alcalines. Par contre, il est soluble dans la plupart des solutions organiques acides (Austin, 1984 ; Roberts, 1992; Kurita, 2006). L'acide le plus couramment utilisé pour préparer une solution de chitosane est l'acide acétique dilué. En général, le chitosane est parfaitement soluble à pH 3-4, les groupes aminés du chitosane ont des protons et le polymère chargé positivement devient soluble. En revanche, il est relativement stable en milieu acide concentré, même s'il se dégrade après une longue exposition (Crini *et al.*, 2009).

La solubilité du chitosane est un paramètre très difficile à contrôler car la valeur de DD a une forte influence sur sa solubilité. La distribution des groupes N-acétyles sur la chaîne polymérique peut contrôler aussi la solubilité (Rinaudo, 2006).

La masse molaire affecte la solubilité du chitosane et ses propriétés rhéologiques notamment sa viscosité. Elle peut également influencer significativement sur les propriétés du polymère en solution, comme le paramètre DD. En effet, une viscosité élevée de la solution peut limiter la possibilité de manipuler des solutions concentrées et d'obtenir des matériaux à forte densité en chitosane. Il s'agit alors de réaliser un compromis entre la rigidité du système (favorisée par des chitosanes de haute masse) et les propriétés rhéologiques de la solution (manipulation plus aisée pour des polymères de faible masse) (Crini *et al.*, 2009).

La viscosité du chitosane dépend du DD, de la concentration, de la température, du poids moléculaire et du pH (Berth *et al.*, 1998 ; Chen et Tsaih, 1998 ; Crini *et al.*, 2009).

Le chitosane est un matériau versatile qui prend des formes physiques facilement modifiables représentées par la figure 7.

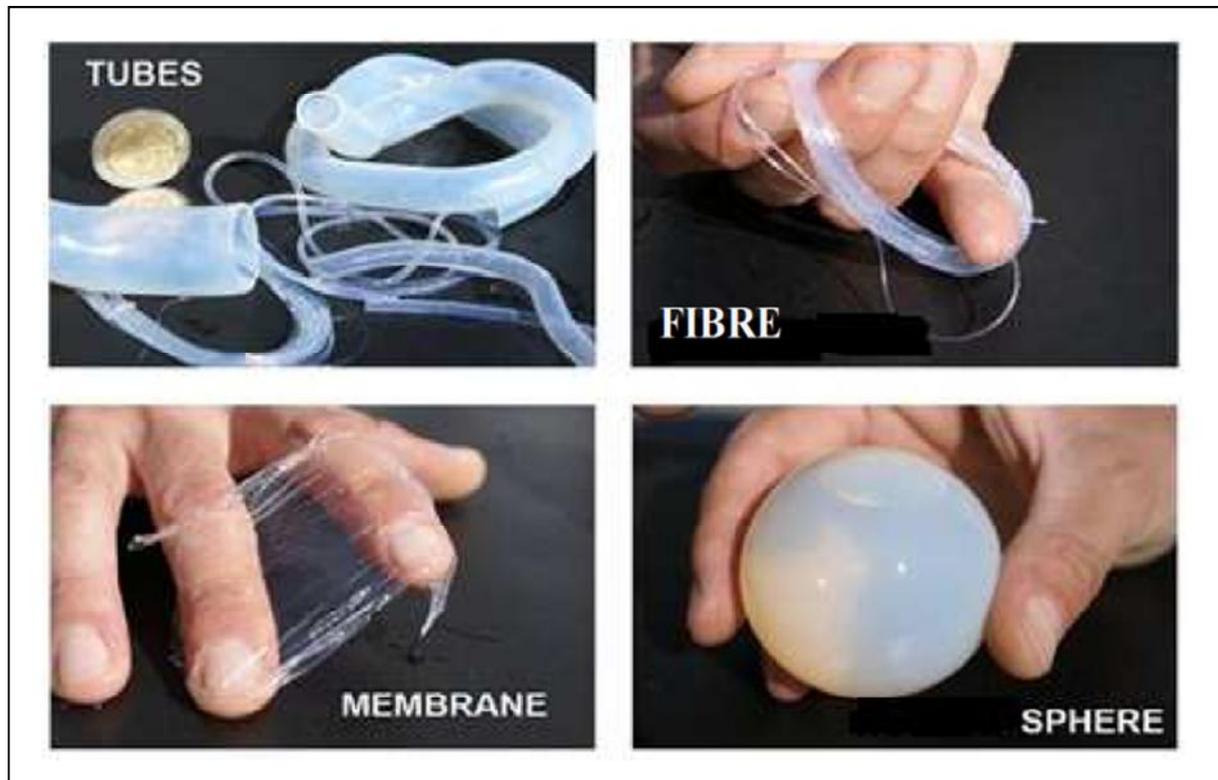


Figure 7 : Quelques exemples de conditionnements du chitosane (Crini *et al.*, 2009).

Le chitosane possède un degré de réactivité chimique dû à ses groupes amines primaires libres. Il possède ainsi des propriétés de rétention d'eau, de chélation d'ions, de complexation de molécules ou des polymères. Le chitosane est un agent de floculation dans le traitement des eaux polluées grâce à son association sélective avec les espèces anioniques, il peut aussi former des complexes polyanion-polycation (Crini *et al.*, 2009).

Le chitosane est un biopolymère qui possède d'exceptionnelles propriétés qui sont à la fois variées et complémentaires, il est non toxique, biodégradable et surtout bioactif. Ce biopolymère est biocompatible, bio-résorbable et ne présente aucun comportement antigénique, il possède un caractère anti-thrombogénique et hémostatique (Onsoyen et Skaugrud., 1990 ; Shi *et al.*, 2006).

Le chitosane inhibe la croissance de nombreuses bactéries et il réduit le développement des infections : c'est donc un bon agent antibactérien. De plus, il a des propriétés anti-tumorales, ainsi que des propriétés cicatrisantes remarquables (Kim *et al.*, 2006).

1-8-Obtention de la chitine et du chitosane

1-8-1- Obtention de la chitine

L'obtention de la chitine peut se faire par voie chimique ou par voie biologique.

1-8-1-1-Voie chimique

L'extraction de la chitine à partir des carapaces nécessite deux étapes essentielles distinctes: la déminéralisation en milieu acide et la déprotéinisation en milieu basique (Percot *et al.*, 2003).

La déminéralisation de la chitine s'effectue habituellement avec une solution d'acide (généralement du HCl à 0,1-1M), afin de transformer les minéraux non solubles de la carapace en sels solubles (Gentilia *et al.*, 2006). Le carbonate de calcium, principal composé minéral de la carapace, réagit avec l'acide pour former du chlorure de calcium, de l'eau et du gaz carbonique. La réaction peut être décrite comme suit :



La plupart des autres minéraux, tels que le magnésium, manganèse et le cuivre présents, réagissent de façon similaire et donnent des sels solubles en présence d'acide. Les sels formés peuvent être séparés de la chitine par une simple filtration suivie d'un lavage à l'eau distillée de la carapace (Duval et Olivier, 2008).

La déprotéinisation de la carapace consiste à solubiliser les protéines dans une solution basique (NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, etc.) (Crini *et al.*, 2009).

1-8-1-2-Voie biologique

La méthode biologique est basée sur l'utilisation de microorganismes fermentaires (tableau II) et/ou d'enzymes protéolytiques (tableau III) qui dégradent les protéines des carapaces en peptides solubles dans la solution aqueuse (Synowiecki et Al- Khateeb, 2003; Percot *et al.*, 2003; Duval et Olivier, 2008).

Tableau II : Quelques exemples de microorganismes fermentaires utilisés pour l'extraction de la chitine.

Microorganismes	Composés actifs	Références
<i>Aspergillus niger</i>	Protéases	Teng <i>et al.</i> , 2001
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Protéase, acide lactique	Rao et Stevens, 2006
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Acide lactique	Jung <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K-187	Protéases, chitinases et lysozymes	Wang et Chio, 1998
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	Protéases	Teng <i>et al.</i> , 2001

Tableau III : Enzymes utilisées pour l'extraction de la chitine (Rao *et al.*, 1998).

Enzymes	Origine	Site de clivage de la liaison peptidique
Chymotrypsines	Animale/ bactérienne	Clivage de l'extrémité C terminal des acides aminés Phe, Trp, Tyr et Leu
Papaïne	Animale	Clivage de l'extrémité C terminal des acides aminés Phe, Val et Leu
Pepsine	Animale	Clivage de l'extrémité N terminal des acides aminés Trp, Phe et Tyr
Subtilisine	Animale/ bactérienne	Clivage de l'extrémité C terminal des acides aminés Phe, Trp, Tyr et Leu
Trypsine	Animale	Clivage de l'extrémité C terminal des acides aminés Lys et Arg

1-8-2- Obtention du chitosane

Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine, par voie chimique ou enzymatique. La chitine β est plus facile à désacétyler que son homologue α , qui est mieux protégée par sa conformation (Kumirska *et al.*, 2010).

1-8-2-1-Voie chimique

Tout comme le procédé d'extraction de la chitine, de nombreuses combinaisons de conditions de désacétylation sont décrites. Généralement, la chitine est chauffée dans une solution de NaOH (ou KOH) concentrée (Chang *et al.*, 1997; Jaworska et Konieczna, 2001 ; Tsai *et al.*, 2002 ; Synowiecki et Al-Khateeb, 2003).

1-8-2-2-Voie enzymatique

La désacétylation enzymatique peut être catalysée par une chitine-désacétylase extraite de *Mucor rouxii* à pH 4,5 à 50 °C (Kafetzopoulos *et al.*, 1993). Cette enzyme est active sur des substrats chitineux supérieurs à 4 unités, et elle présente un degré d'activité plus élevé lorsque le substrat présente une solubilité plus élevée (Martinou *et al.*, 1995, Martinou *et al.*, 1998). La désacétylation enzymatique semble hydrolyser les liaisons N-acétyles de façon aléatoire (Kumirska *et al.*, 2010).

1-9-Les applications de la chitine et du chitosane

Les activités biologiques, incluant les propriétés antifongiques et antibactériennes, la stimulation des réactions de défense chez les plantes et les propriétés curatives font de la chitine et du chitosane des biopolymères très intéressants pour des applications dans plusieurs domaines (tableaux IV et V) tels que l'agriculture, l'agroalimentaire, la médecine, la cosmétologie, le textile et le traitement des eaux usées.

Tableau IV : Quelques applications de la chitine

Domaine	Rôle (application)	Références
Agricole	Éliciteur (inducteur) des mécanismes de défense des plantes (confère une résistance contre les infections et les agressions parasitaires)	Wan <i>et al.</i> , 2008
	Agents de conservation des fruits et légumes (fraises, poivrons, concombres et tomates)	Zhang <i>et al.</i> , 2011
Traitement des eaux	Agents de chélation des cations et des ions métalliques (Cd^{2+})	Xiong, 2010
Agroalimentaire et diététique	Préservation de la qualité des aliments (antimicrobien, antioxydant)	Benhabiles <i>et al.</i> , 2012
	Additif alimentaire (structurant, texturant émulsifiant)	Crini <i>et al.</i> , 2009
	agent hypocholestérolémiant et réducteur de l'adsorption des lipides	Simunek et Bartonova, 2005
Médical	Capacités cicatrisantes	Koide, 1998
	Capacités immunologiques, anti-tumorales et hémostatiques	Jayakumar <i>et al.</i> , 2006
	Fabrication des fils de suture et transporteurs de substances médicamenteuses	Foscolo et Phillipon, 1997
Cosmétologie	Formulation des crèmes hydratantes et amincissantes	Simon et chevalier, 2000
Industrie papetière	Fabrication de la cellulose	Ifrimer, 2010
Microbiologie	La production des bio-fongicides	Chang <i>et al.</i> , 2006

Tableau V : Quelques applications du chitosane.

Domaine	Rôle (application)	Références
Biomédical	Peaux artificielles	Gopal <i>et al.</i> , 2015
	Réduction du taux de cholestérol et de la glycémie	Chang <i>et al.</i> , 2012
	Bactéricide et antifongique	Tikhonov <i>et al.</i> , 2006
	Capsule pour le relargage des médicaments	Kumar, 2000
	Membrane pour dialyse	Kalia et Avenus, 2011
Agriculture	Eliciteur de résistance et de défense contre les pathogènes chez les plantes	Benhamou et Picard., 1999
	Stimule la croissance des plantes et la libération de fertilisants et nutriments	Boonlertnirun <i>et al.</i> , 2008
Traitement des eaux	Pouvoir séquestrant (métaux lourds)	Rhazi <i>et al.</i> , 2002
Alimentation	Agent antioxydant (conservateur pour poisson)	Kamil <i>et al.</i> , 2002
	Capacité prébiotique	Lee <i>et al.</i> , 2002
	Formation de films protecteurs	Sebti <i>et al.</i> , 2006
	Capacité gélifiante	Gomez-Guille <i>et al.</i> , 2005
	Capacité émulsifiante	Desbrieres <i>et al.</i> , 2010
	Clarification des boissons (jus de pomme)	Abd et Niamah, 2012
Cosmétique	Agent protecteur des cheveux (champoing, lotions et produits de rinçage).	Kumar, 2000
Biopharmaceutique	Immunostimulant et antitumoral	Yang et Zaharoff, 2013
Biotechnologie	Immobilisation des enzymes	Huang <i>et al.</i> , 2007
Industrie papetière	Additif pour le revêtement des feuilles de papier	Abdelkader-Nassar <i>et al.</i> , 2014
Textile	Amélioration de la teinture	Ramadan <i>et al.</i> , 2011

Chapitre 2 : Plans d'expérience

2-1-Introduction

Le comportement des produits industriels précisément alimentaires est généralement influencé par de nombreux phénomènes, souvent dépendants les uns des autres. Pour prévoir ce comportement, le produit et les phénomènes sont modélisés, et des simulations sont effectuées ; la pertinence des résultats des simulations dépend de la qualité des modèles. En particulier, dans le cadre de la conception ou reconception d'un produit, les modèles font généralement intervenir un certain nombre de grandeurs physiques que l'on s'autorise à modifier, appelées paramètres. Le problème du concepteur est alors de trouver les "bonnes" valeurs de ces paramètres, c'est-à-dire celles qui feront que le produit aura le comportement attendu ; cela nécessite d'identifier l'influence des paramètres sur la réponse du produit. Cela passe généralement par des études expérimentales, consistant à imposer différentes valeurs de ces paramètres et à mesurer les réponses obtenues. Or, les essais sont coûteux, et ce d'autant plus que le nombre de paramètre à faire varier est important.

2-2-Définition

Selon Savary *et al.* (2009), les plans d'expériences consistent à sélectionner et ordonner les essais afin d'identifier, à moindre coût, les effets des paramètres sur la réponse du produit. La mise en œuvre de ces méthodes comporte trois étapes :

- 1-Postuler un modèle de comportement du système (avec des coefficients pouvant être inconnus) ;
- 2-Définir un plan d'expériences, c'est-à-dire une série d'essais permettant d'identifier les coefficients du modèle ;
- 3-Faire les essais, identifier les coefficients et conclure.

Les plans d'expériences offrent un moyen simple et efficace de réduire le coût et d'augmenter la robustesse des études expérimentales effectuées lors de la conception ou de la validation d'un produit industriel. Ils permettent d'utiliser toute la connaissance du produit dont le concepteur peut disposer a priori tout en contrôlant un ou plusieurs paramètres à la fois. Ainsi, il y aura une économie de temps, d'effort et de produits (nombres d'essais à effectuer).

2-3-Modélisation

2-3-1-Facteurs, niveaux et réponses

La première étape consiste à recenser les paramètres du système. Ces paramètres correspondent à des grandeurs physiques du produit, que l'on peut régler directement ou que l'on s'autorise à modifier.

La seconde étape est de préciser les valeurs que l'on souhaite leur donner. Sur le produit réel, les paramètres peuvent varier de façon continue ou discrète.

Les paramètres que l'on fait varier au cours des essais sont appelés facteurs, et les valeurs possibles que l'on attribue à un facteur sont appelées niveaux.

La réponse est la grandeur mesurée lors de l'essai.

2-3-2-Modèle

2-3-2-1- Définition

Le modèle est la relation mathématique donnant la réponse en fonction des facteurs. Le but des essais est d'identifier ce modèle de comportement. La réponse s'exprime à l'aide d'une fonction des facteurs, et uniquement des facteurs :

$$Y = f(x_1, \dots, x_n) \quad (2)$$

Où Y est la réponse et x_1, \dots, x_n sont les facteurs.

L'écriture du modèle consiste simplement à postuler une forme pour f, faisant intervenir des coefficients qui seront identifiés au cours des essais.

2-3-2-2-Les modèles

Les exemples les plus courants sont :

2-3-2-2-1-Modèle affine sans interactions

Le choix le plus simple est le suivant :

$$Y = c + \sum_{i=1}^n a_i x_i \quad (3)$$

Il s'agit d'un modèle affine par rapport à chacun des facteurs (en fixant tous les facteurs autres que x_i , on a une relation du type $f(x_i) = Ax_i + B$). Notons que l'influence de chacun des facteurs sur la réponse va toujours dans le même sens : si a_i est positif, la réponse sera toujours croissante en fonction de x_i (Savary *et al.*, 2009).

2-3-2-2-2- Modèle affine avec interactions doubles

Le modèle linéaire est souvent insuffisant, car les facteurs agissent rarement de manière indépendante les uns des autres, l'influence d'un facteur sur la réponse peut dépendre du niveau des autres facteurs. Or, ce type de comportement ne peut être représenté correctement par la forme précédente, l'influence de x_1 y est uniquement déterminée par la valeur du coefficient a_1 . Pour introduire cette dépendance, on peut ajouter des termes "croisés" au modèle précédent ; on obtient alors la forme suivante :

$$Y = c + \sum_{i=1}^n a_i x_i \quad (4)$$

2-3-2-2-3-Modèle affine avec interactions d'ordre supérieur

La notion d'interaction peut se généraliser à plus de deux variables. Par exemple, un modèle avec interactions d'ordre 3, ou interactions triples, s'écrit sous la forme suivante :

$$Y = c + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n \sum_{k=j+1}^n c_{ijk} x_i x_j x_k \quad (5)$$

Les produits triples permettent de modéliser des phénomènes se produisant lorsque trois facteurs sont à un niveau donné. On définit de même des interactions d'ordre 4, 5... Dans un modèle à n facteurs, il existe ainsi des interactions jusqu'à l'ordre n.

2-4-Les catégories des plans d'expériences

Les plans d'expérience reposent sur plusieurs théories, on peut les classer en deux catégories :

2-4-1-Les plans réduits

Ces plans consistant à sélectionner certaines combinaisons qui permettent naturellement de réduire les coûts mais qui diminuent également l'information disponible sur le comportement du système, l'usage de ces plans demande tout d'abord d'écrire le modèle (c'est-à-dire de lister les facteurs et les interactions à prendre en compte) et de choisir le nombre de niveaux des facteurs (Savary *et al.*, 2009).

2-4-2-Les plans complets

C'est une catégorie de plans qui fournit une information la plus complète possible sur des systèmes présentant relativement peu de facteurs. Elle consiste à tester toutes les

combinaisons possibles, autrement dit, toutes les combinaisons de toutes les modalités des différents facteurs sont examinées (Droesbeke *et al.*, 1997).

Selon Savary *et al.*, (2009), l'une des techniques les plus simples a été proposée par Yates et Hunter, pour le cas où chaque facteur n'a que deux niveaux. Elle consiste à numéroter les facteurs et à faire varier successivement leurs niveaux de la façon suivante :

- Au premier essai, tous les facteurs sont au niveau bas.
- On change le niveau du premier facteur à chaque essai...
- Celui du deuxième facteur tous les 2 essais...
- Et, plus généralement, celui du k-ième facteur tous les 2^{k-1} essais.

La méthode peut s'adapter au cas où les facteurs ont plus de deux niveaux.

Dans le cadre d'un modèle affine, ce plan permet d'identifier l'influence de tous les facteurs et de toutes les interactions, jusqu'à l'ordre maximal.

Parmi les plans complets, on trouve la méthode des surfaces de réponses.

2-4-2-1-La Méthode des surfaces de réponses

2-4-2-1-1-Définition

La méthode des surfaces de réponses consiste en un ensemble de techniques mathématiques et statistiques utiles pour modéliser et analyser des problèmes où une réponse est affectée par différents facteurs (Rioux, 2008).

C'est une étude quantitative, l'objectif étant d'optimiser la réponse.

Le plan de second degré ou de surface de réponse permet d'établir des modèles mathématiques de second degré. Il est utilisé pour les variables continues (Goupy, 2006).

2-4-2-1-2- Les Modèles de surface de réponse

Il existe différents types de modèles. Parmi eux, on distingue :

- **Plans de type « poupées russes »**

Ce modèle se réalise par les étapes suivantes :

- Tamassage des facteurs ;
- La recherche de la région de l'optimum en utilisant la méthode de la pente maximale ;
- Optimisation de la surface de réponse.

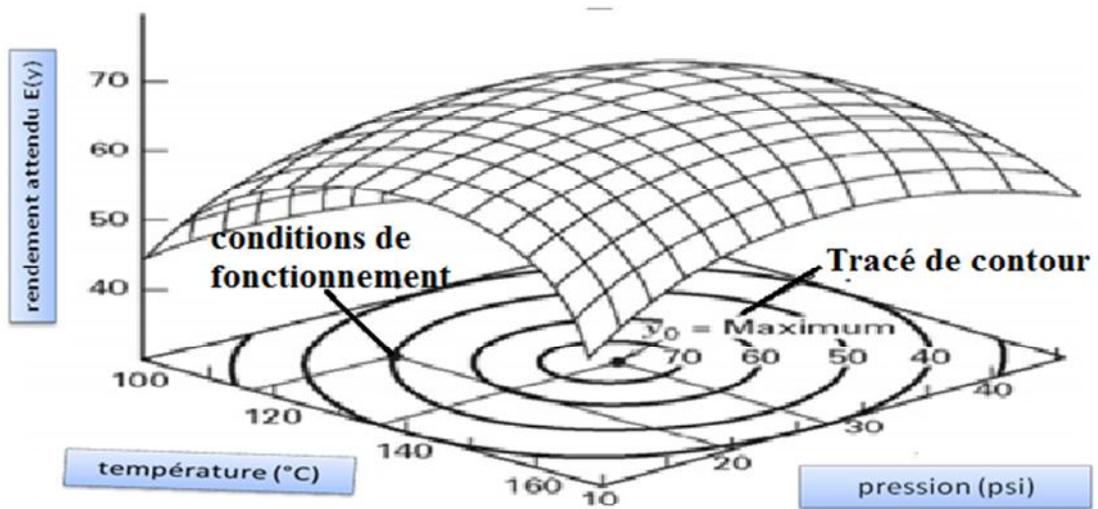


Figure 8 : Plan de type poupées russes (Rioux M, 2008)

- **Expérimentation séquentielle :**

La réalisation de ce modèle se fait par les étapes suivantes :

- Tamissage des facteurs ;
- Recherche de la région de l'optimum ;
- Modélisation et optimisation de la surface de réponse.

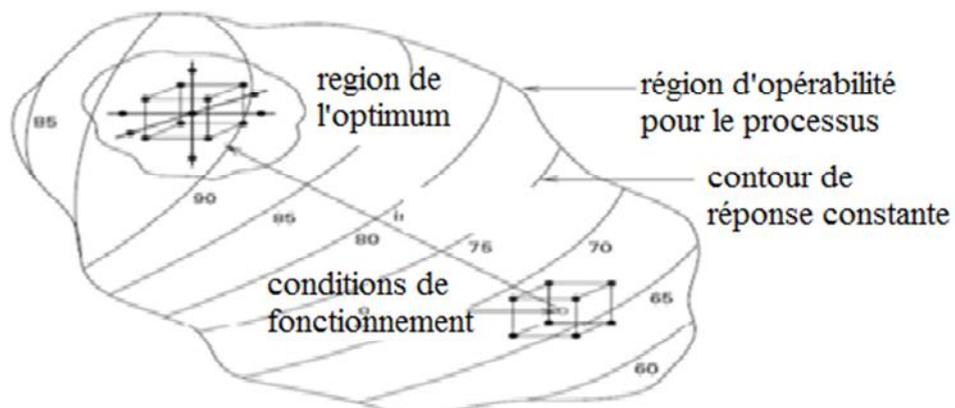


Figure 9 : Expérimentation séquentielles (Rioux M, 2008)

2-4-2-1-2-Représentation graphique

La représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse nécessite un espace ayant une dimension de plus que l'espace expérimental. Un plan à deux facteurs utilise un espace à trois dimensions pour être représenté : une dimension pour la réponse (axe vertical), deux dimensions pour les facteurs (axes horizontaux).

À chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. À l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse.

L'interprétation graphique de l'équation de surface de réponse est très utile dans la recherche de l'optimum, il s'agit de déterminer les valeurs (x_1, \dots, x_n) de m facteurs quantitatives qui optimise la réponse y (Goupy, 2006).

Partie II :

Partie

expérimentale

Chapitre 1 : Matériel et Méthodes

Notre travail expérimental a été réalisé au niveau du laboratoire d'analyses physicochimiques commun II de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Les analyses de spectroscopie infrarouge de tous les échantillons de la matrice expérimentale ont été réalisées au niveau du laboratoire d'analyses FTIR de la faculté d'hydrocarbure et de chimie de l'université M'hamed Bougara de Boumerdès.

Les analyses FTIR de la chitine et de l'échantillon représentant les paramètres optimaux ont été réalisées au niveau du laboratoire de recherche de la faculté de chimie de l'université des sciences et de la technologie Houari Boumediene sise à Alger.

Les analyses de diffraction des rayons X ont été effectuées au niveau du laboratoire des sciences alimentaires de la faculté de l'ingénierie de l'université M'hamed Bougara de Boumerdès.

Dans le cadre de ce travail, nous avons procédé à l'extraction de la chitine à partir de la carapace de crevettes rouges *Aristeus antennatus* (RISSO, 1816), dites royales, par déminéralisation des carapaces à l'aide d'acide chlorhydrique (HCl) et déprotéinisation par de la soude (NaOH). Cette même chitine a servi à la préparation du chitosane ; l'objectif de ce travail étant d'optimiser la préparation du chitosane à partir de la chitine. Pour ce faire, la désacétylation de la chitine a été effectuée par un traitement alcalin (NaOH). L'optimisation a pu être réalisée par le biais de la méthode des surfaces de réponses, qui est un plan d'expériences utilisant une matrice offrant un ensemble de conditions opératoires (température, temps et concentration en NaOH) à appliquer, afin d'étudier le phénomène de désacétylation de la chitine et de pouvoir l'optimiser.

Le DD des produits de chaque expérience a été déduit après analyse FTIR.

Le logiciel Statistica release 7.0 a été utilisé pour le traitement des données afin de déterminer les conditions optimales d'obtention du chitosane. Les conditions optimales déduites ont été, par la suite, testées expérimentalement.

L'analyse DRX a été effectuée pour étudier la cristallinité du chitosane.

1-Matériel

1-1-Matériel biologique

Des crevettes rouges (royales) *Aristeus antennatus* (RISSO, 1816) ont été achetées du marché de poisson de Tizi-Ouzou (Figure 10).



Figure 10 : Carapaces de crevettes rouges (royales) crevettes rouges *Aristeus antennatus* (RISSO, 1816)

1-2-Matériel chimique

1-2-1-Solutions et produits utilisés

- ❖ Hydroxyde de sodium (NaOH) en pastilles blanches (laboratoire Biochem-
Chemopharma, Canada) ;
- ❖ Acide chlorhydrique (HCl) 32% en solution (Laboratoire Carlo erba, Val-de-Reuil) ;
- ❖ Bromure de potassium (KBr) ;
- ❖ Eau distillée.

1-2-2-Le petit matériel

- ❖ Verreries de laboratoire : des fioles, éprouvettes graduées, entonnoirs, béchers, flacons et des tubes à essais ;
- ❖ Robot électroménager.
- ❖ Papier aluminium

1-3-Appareillage

- ❖ Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) (Brucker alpha).
- ❖ Diffractomètre de poudres (Xpert PRO) ;

- ❖ Etuve (Mettler, modèle UM 200, France) ;
- ❖ Dessiccateur ;
- ❖ Agitateur magnétique à plaque chauffante (VWR série Advanced, VWR international) ;
- ❖ Agitateur magnétique (J.R. SELECTA, s.a, série 0343266, France) ;
- ❖ pH mètre (inoLab, D882362, Allemagne) ;
- ❖ Thermomètre ;
- ❖ Balance de précision (KernModel 770-60 Analytical balance (0.01 mg accuracy), Allemagne).

2-Méthodes

2-1-Prétraitement des carapaces

Les crevettes sont lavées à de l'eau du robinet et débarrassées de leurs têtes, pattes et chairs.

Les carapaces obtenues sont bouillies dans de l'eau pendant une heure, broyées et séchées à 160 °C (Figure11).

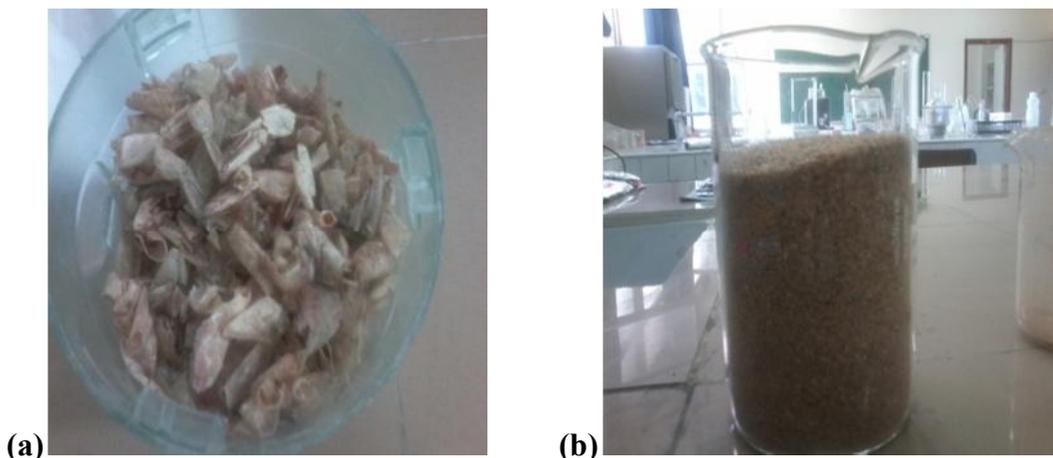


Figure 11 : Carapaces de crevettes avant (a) et après broyage (b).

2-2-Extraction de la chitine

L'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevettes a été réalisée par déminéralisation et déprotéinisation chimiques de celle-ci.

2-2-1-Etape de déminéralisation

La déminéralisation de la poudre de carapaces est réalisée en la mélangeant avec une solution d'acide chlorhydrique(HCl) à 1,2M ; le rapport solide-liquide étant de 2/40 (g/ml). La

réaction est effectuée à 30°C sous agitation continue pendant 75 minutes. La poudre de carapace, ainsi déminéralisée, est rincée avec de l'eau du robinet jusqu'à atteindre le pH 7,0 pour éliminer les composants acides. Cette poudre est ensuite rincée avec de l'eau distillée et séchée à l'étuve.

2-2-2-Etape de déprotéinisation

La déprotéinisation de la poudre de carapaces, préalablement déminéralisée, est réalisée en la mélangeant avec une solution de soude (NaOH) à 2,42M ; le rapport solide-liquide étant de 2/40 (g/ml). La réaction est effectuée à 30°C sous agitation continue pendant 75 minutes. La poudre de carapace, ainsi déprotéinée, est rincée avec de l'eau du robinet jusqu'à atteindre le pH 7,0 pour éliminer les composants basiques. Cette poudre est ensuite rincée avec de l'eau distillée et séchée à l'étuve, son poids aussi a été noté.

2-3-Optimisation de la désacétylation chimique de la chitine

L'optimisation de la désacétylation chimique de la chitine a été effectuée par la méthode des surfaces de réponses. Pour ce faire, la matrice indiquée dans le tableau VI a permis d'effectuer 16 expériences de désacétylation ; pour chaque expérience, 2g de chitine sont mélangés à 20 ml de NaOH. Les expériences ont été réalisées sous agitation continue. Les résidus obtenus ont été filtrés, rincés avec de l'eau du robinet jusqu'à atteindre le pH 7,0, puis rincés, une dernière fois, avec de l'eau distillée. Ces résidus sont séchés à l'étuve à 100°C et pesés après chaque opération de séchage.

Tableau VI : Matrice de surfaces de réponses utilisée pour la désacétylation de la chitine.

Expérience	Concentration NaOH (M)	Temps d'incubation (minutes)	Température d'incubation (°C)
1	0,5	80	20
2	0,5	80	40
3	0,5	300	20
4	0,5	300	40
5	2	80	20
6	2	80	40
7	2	300	20
8	2	300	40
9	0,03	190	30
10	2,5	190	30
11	1,25	10	30
12	1,25	370	30
13	1,25	190	14
14	1,25	190	47
15	1,25	190	30
16	1,25	190	30

2-4-Caractérisation des produits obtenus

2-4-1-Détermination du degré de désacétylation

2-4-1-1-Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Il s'agit d'une méthode essentiellement qualitative, qui permet d'obtenir des informations structurales, ou de tester la pureté d'une substance.

Les différentes fonctions chimiques présentes sur une molécule donnée sont responsables des bandes d'absorption caractéristiques; les liaisons entre les atomes vibrent selon une fréquence qui dépend de la masse des atomes engagés et de la rigidité relative de la liaison. Cette dernière absorbe des ondes infrarouges spécifiques selon la fréquence de sa vibration (Tayeb, 2013). Ainsi, l'analyse infrarouge permet d'identifier les plages de fréquences d'absorption d'un échantillon et de déterminer par la suite les groupements chimiques conséquents (Duval et olivier, 2008).

2-4-1-1-1-Principe

Le principe de fonctionnement du FTIR est fondé sur l'énergie apportée par le faisceau IR qui, lorsqu'elle est au voisinage de l'énergie de vibration de la molécule, va absorber le rayonnement. Ceci va aboutir à une diminution de l'intensité, réfléchié ou transmise, qui sera enregistrée. Le domaine infrarouge entre 400 cm^{-1} et 4000 cm^{-1} correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules.

La position des bandes de vibration va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse. Par conséquent, un matériau de composition chimique et de structure donnée va générer un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques de la nature des liaisons chimiques, de leur proportion et de leur orientation (BiophyResearch, 2012).

2-4-1-1-2-Méthode

Dans la présente étude, le spectre infrarouge a été obtenu à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR (Brucker alpha) associé à un logiciel OP65 (Figure 12).

Le mode opératoire consiste à broyer 3 à 4 mg de chaque échantillon de chitine désacétylée avec 145 mg de KBr. Le mélange est compacté sous presse pour former des pastilles qui vont être placées dans le spectromètre infrarouge (domaine de nombre d'ondes allant de 400 cm^{-1} à 4000 cm^{-1}).



Figure 12 : Spectrophotomètre FTIR (Brucker alpha).

La spectroscopie infrarouge nous permet de déterminer le degré de désacétylation de la chitine, en appliquant l'équation (6) préposée par Domszy et Roberts (1985) :

$$DD\% = 100 - [(A_{1655}/A_{3450}) \cdot 100 / 1,33] \quad (6)$$

Où :

- A_{1655} est l'absorbance à la longueur d'onde 1655 cm^{-1} (amide I) ;
- A_{3450} est l'absorbance à la longueur d'onde 3450 cm^{-1} (hydroxyle) ;
- Le facteur **1,33** représente le rapport A_{1655}/A_{3450} pour une chitine entièrement N-acétylée.

3-4-2--Etude de la cristallinité

3-3-2-1-Analyse par diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X est utilisée dans l'étude de la cristallinité des différents matériaux, elle permet d'identifier la présence de composés susceptibles d'être liés à l'échantillon.

Les spectres de diffraction ont été obtenus par le diffractomètre Philips PWO4 XPertPROx-ray (Figure 13) avec une tension de 45 kV, un courant de 40 mA, dans un intervalle de $0-100^\circ$, le temps d'exposition est de l'ordre de 2,94 seconde par pas.

La méthode consiste à bombarder l'échantillon avec des rayons X, et à regarder l'intensité de rayons X qui est diffusée selon l'orientation dans l'espace (Le saout, 2008). Les résultats numériques ont été transférés sur le logiciel origin Pro 8 pour tracer les spectres.



Figure 13 : Diffractomètre de poudres (Philips PWO4 XPert pro x-ray).

3-4-Détermination des paramètres optimaux de la désacétylation de la chitine

3-4-1- Application de la méthode des surfaces de réponses

Pour optimiser l'obtention du chitosane avec un haut DD, on a eu recours à la méthode des surfaces de réponses.

Le plan d'expérience de type surfaces de réponse est un plan complet qui consiste à déterminer les combinaisons optimales des facteurs d'entrée qui permettent d'optimiser la variable de sortie en un nombre d'expériences minimal. Dans la présente étude, la variable de sortie à optimiser est le DD. L'application de ce plan d'expériences est faite à l'aide du logiciel statistica release 7, qui permet de modéliser les résultats sous forme d'une fonction polynomiale du second degré (eq 7)

$$Y = c + \sum_{i=1}^n a_i X_i + b_i X_i^2 + \sum_{i < j} a_{ij} X_i X_j \quad (7)$$

Y : Réponse (DD) mesurée au cours des expériences ;

X_i et X_j : Niveaux attribués aux facteurs (concentration NaOH, temps, température)

c : Ordonnée à l'origine ;

a_i et a_j : Coefficients associés aux facteurs X_i et X_j , respectivement (Goupy, 2006).

Le tableau VII représente les valeurs réelles et codées des 3 paramètres (facteurs).

Tableau VII : Valeurs réelles et codées de la matrice utilisée.

Experience	Concentration NaOH (M)		Temps (min)		Température (°C)	
	Valeurs réelles	Valeurs codées	Valeurs réelles	Valeurs codées	Valeurs réelles	Valeurs codées
1	0,5	-1	80	-1	20	-1
2	0,5	-1	80	-1	40	+1
3	0,5	-1	300	+1	20	-1
4	0,5	-1	300	+1	40	+1
5	2	+1	80	-1	20	-1
6	2	+1	80	-1	40	+1
7	2	+1	300	+1	20	-1
8	2	+1	300	+1	40	+1
9	0,03	-1,68	190	0	30	0
10	2,5	+1,68	190	0	30	0
11	1,25	0	10	-1,68	30	0
12	1,25	0	370	+1,68	30	0
13	1,25	0	190	0	14	-1,68
14	1,25	0	190	0	47	+1,68
15	1,25	0	190	0	30	0
16	1,25	0	190	0	30	0

Chapitre 2 : Résultats et discussion

2- Caractérisation de la chitine avant et après désacétylation

2-1- Caractérisation par FTIR

2-1-1- Caractérisation par FTIR de la chitine extraite des carapaces

Dans le cadre de cette étude, la chitine a été extraite, des carapaces de la crevette rouge *Aristeus antennatus* (RISSO, 1816), en deux étapes successives consistant en la déminéralisation et la déprotéinisation des carapaces. Le spectre FTIR de la chitine, ainsi extraite, est représenté par la figure 14. Celui-ci montre la présence de pics caractéristiques de la chitine. Il s'agit de la :

- présence d'un pic, dans la plage $1000-1250\text{ cm}^{-1}$, caractéristique de la vibration d'élongation de la liaison C-N ;
- présence d'un pic, à 1303 cm^{-1} , représentant les vibrations de déformation de la liaison CH_3 et un autre pic, à 1387 cm^{-1} , caractéristique de la liaison de déformation CH_2 ;
- présence de 2 pics représentant les vibrations de déformations de la liaison N-H, dans la plage $1550-1650\text{ cm}^{-1}$ et à 3400 cm^{-1} ;
- présence d'un pic, à 1650 cm^{-1} , caractéristique de la liaison de C=O ;
- présence de 2 pics représentant les liaisons de déformations de la liaison O-H, à 2900 cm^{-1} et à 3400 cm^{-1} .

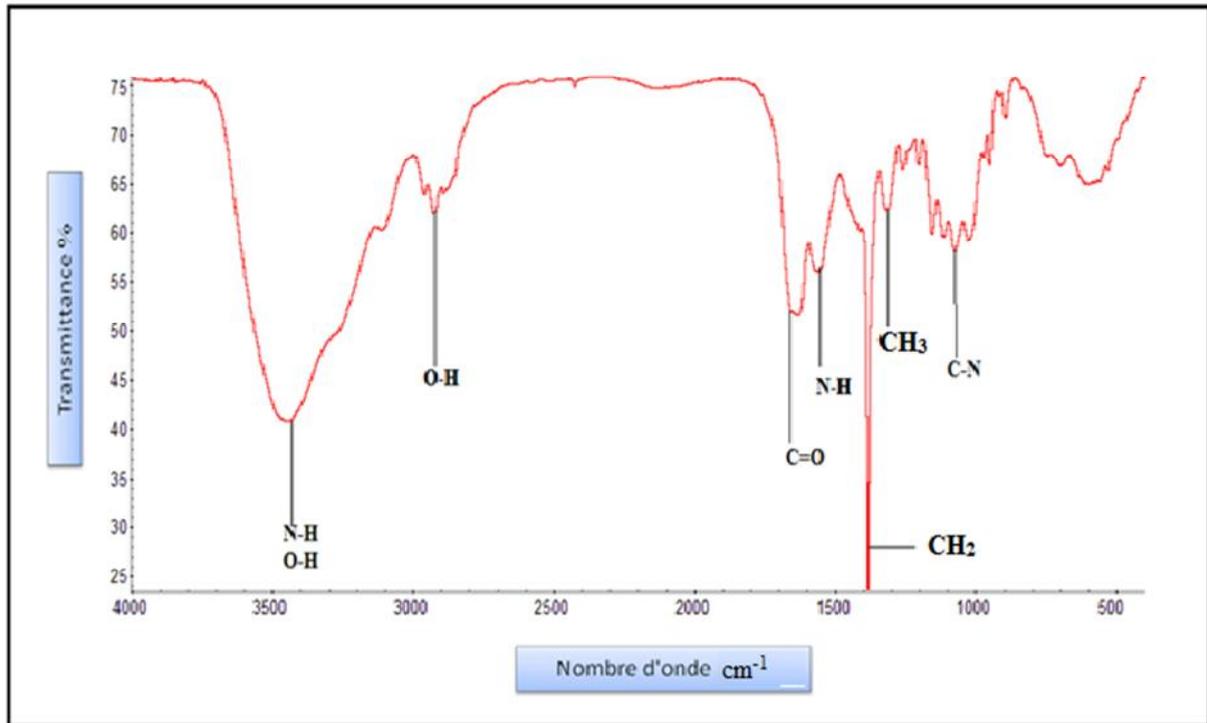


Figure 14 : Spectre infrarouge de la chitine extraite des carapaces de la crevette rouge.

Des études sur la caractérisation de la chitine par infrarouge ont démontré, qu'en cas d'impureté (présence de protéines, minéraux et autres composants résiduels), il y a présence de pics représentant d'autres groupements chimiques n'appartenant pas à la chitine. En effet, Le Roux (2012) a démontré que la présence de protéines résiduelles dans l'échantillon provoque une augmentation de l'intensité d'absorbance à des pics communs à la chitine notamment dans la plage 2800-3500 cm^{-1} . De même Falini *et al.* (2003) ont mis en évidence des bandes spécifiques aux protéines et à la chitine qui se chevauchent. Furuhashi *et al.* (2009), quant à eux, ont comparé les spectres de protéines (BSA) et de polysaccharides purs (mannane et glucane) au spectre de la chitine extraite de coquilles de différentes espèces de mollusques (*Acanthopleura villantii*, *Pictodentalium vernedei*, *Mytilus galloprovincialis*). Leur étude a pu démontrer que les bandes caractéristiques de la chitine coïncident à la fois avec celles des polysaccharides et des protéines. Ainsi, Paulino *et al.* (2006) affirment que l'augmentation d'intensité de certains pics observable en FTIR est due à la présence d'impuretés résiduelles.

2-1-2-Caractérisation par FTIR des échantillons de chitine désacétylée

Les spectres infrarouges obtenus à partir des échantillons de chitine désacétylée sont présentés par la figure 15 et l'annexe 1. L'exploitation des différentes bandes obtenues a

démontré l'existence de bandes d'absorption représentant les groupements fonctionnels caractéristiques du chitosane (figure 14), il s'agit de :

- 1000-1300 cm^{-1} : vibration d'élongation de la liaison C-N ;
- 1550-1650 cm^{-1} : vibration de déformation de la liaison N-H ;
- 1600-1700 cm^{-1} : vibration d'élongation de la liaison C=O ;
- 2500-3500 cm^{-1} : vibration d'élongation de la liaison N-H et O-H.

La majorité des spectres du chitosane présente une similarité dans les plages d'absorption avec une différence dans l'intensité d'absorption. En comparant les spectres FTIR de la chitine (Figure 14) et du chitosane (Figure 15), on remarque un changement dans l'intensité de la fréquence d'absorption de vibrations de déformation de la liaison N-H, démontrant une augmentation du nombre de groupements NH_2 , et confirmant ainsi la désacétylation de la chitine.

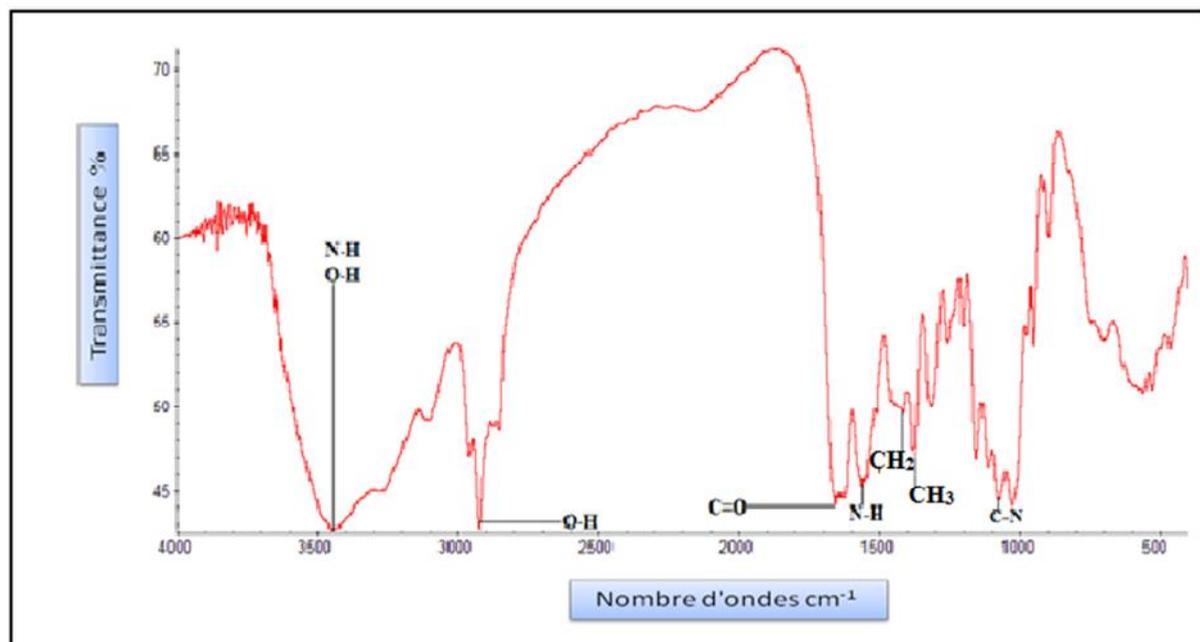


Figure 15 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°1.

2-2-Caractérisation par diffraction aux rayons X de certains échantillons de chitine désacétylée

Les spectres de diffraction aux rayons X concernant les produits des expériences (1 à 5) sont représentés par la figure 16 et l'annexe 2. Ces spectres ont une similarité importante dans la plage de diffraction. En effet, il y a présence de 2 pics, l'un représentant une forte intensité de diffraction, à 20° , et l'autre représentant une moins forte intensité de diffraction, à 10° , caractéristiques du chitosane. En effet, selon Muzzarelli *et al.* 2004, la chitine est caractérisée

par 2 pics de moyennes intensités, à 9 -10° et 20-21°, alors que le chitosane est caractérisé par 1 pic de grande intensité, à 20°, et 1 pic de moyenne intensité, à 10°.

La présence de structure cristalline caractéristique du chitosane dans notre étude démontre l'influence du traitement de désacétylation sur la chitine par le biais de remaniements structurels au cours de ce processus.

Yen *et al.*, 2007 ont aussi trouvé que le chitosane fongique présentait 2 larges pics de diffraction à 10 ° et 20 °. Ce type de spectre est caractéristique des chitosanes de types α et γ .

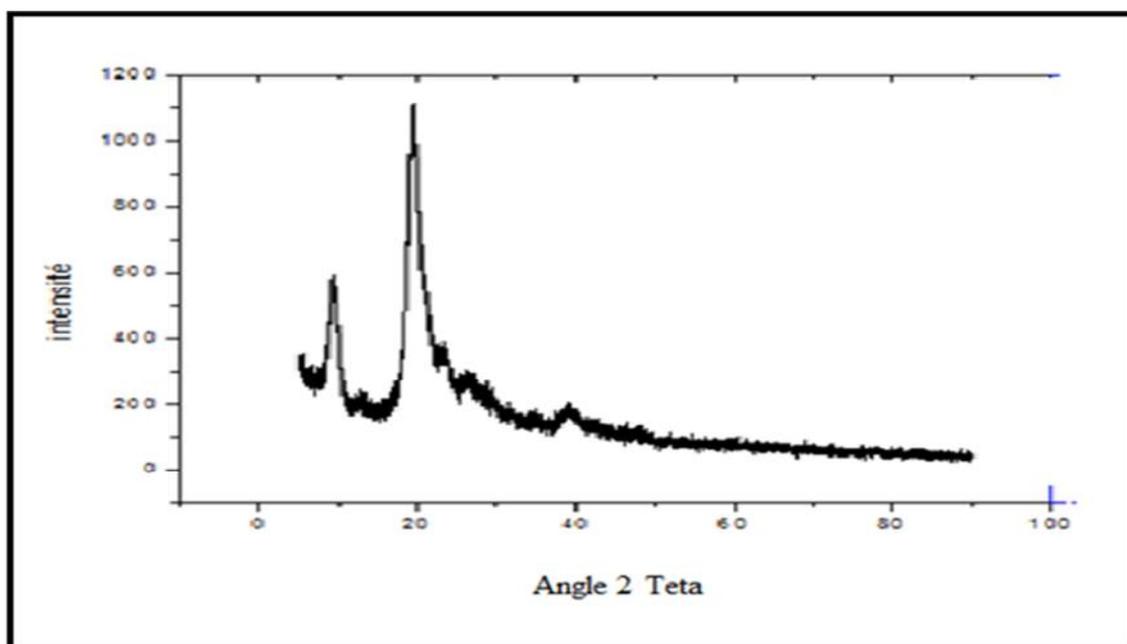


Figure 16 : Spectre de diffraction aux rayons X du produit de l'expérience N°1.

2-3-Calculs des degrés de désacétylation

Les résultats des valeurs d'absorbance et de transmittance obtenue par projection sur les spectres FTIR ainsi que les DD obtenus par application de l'équation de Domszy et Roberts (1985), sont présentés dans le tableau VIII :

Tableau VIII : Résultats obtenus après calcul des DD par la méthode de Domszy et Roberts (1985).

Expérience	T		A		DD (%)	Expérience	T		A		DD (%)
	1655 cm ⁻¹	3450 cm ⁻¹	1655 cm ⁻¹	3450 cm ⁻¹			1655 cm ⁻¹	3450 cm ⁻¹			
1	0,44	0,42	2,24	2,35	27,87	9	0,65	0,65	1,52	1,51	22,86
2	0,63	0,68	1,57	1,47	18,47	10	0,335	0,34	2,9	2,94	39,84
3	0,60	0,52	1,66	1,89	33,69	11	0,31	0,28	3,22	3,50	29,87
4	0,69	0,64	1,43	1,55	30,18	12	0,316	0,313	3,15	3,19	24,81
5	0,5	0,56	2	1,77	15,42	13	0,37	0,25	2,64	3,92	49,87
6	0,53	0,52	1,87	1,89	24,81	14	0,33	0,31	2,98	3,17	30,51
7	0,17	0,14	5,63	6,77	40,29	15	0,99	0,98	1,01	1,02	25,47
8	0,13	0,09	7,69	11	47,95	16	0,99	0,98	1,01	1,02	25,47

A : absorbance

T : Transmittance

2-4-Analyse des résultats par la méthode de surfaces de réponses

2-4-1- Réponse obtenue (DD%)

Dans la présente étude, la modélisation de la désacétylation de la chitine a été effectuée par la méthode de surface de réponse. Les résultats obtenus (tableau VIII) montrent clairement l'existence d'une variation des DD en fonction des expériences réalisées suggérant une influence des conditions de désacétylation (facteurs) sur la variation des DD. Les valeurs de DD obtenues sont inférieures à 50% ; la valeur de DD la plus élevée (49,87%) étant attribuée à l'expérience N°13. Ceci nous amène à conclure que les conditions douces utilisées dans le cadre de cette étude ont permis de désacétyler la chitine. Néanmoins, cette désacétylation n'a pas permis d'aboutir à du chitosane (DD>50%).

2-4-2-Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats de désacétylation par la méthode de surfaces de réponses est résumée dans le tableau IX. Elle comprend les effets des facteurs, les coefficients du modèle et les valeurs *p* et *t*. Selon le tableau IX, les résultats montrent que les valeurs *p* de l'effet linéaire du facteur concentration NaOH, temps d'incubation et celle de la température sont hautement significatives (<0,01), ceci démontre que ces facteurs présentent un effet sur le DD au seuil statistique retenu. Par ailleurs, les résultats de la valeur *p* des effets quadratiques

sont comme suit : un effet significatif ($<0,05$) pour le facteur concentration NaOH, hautement significatif ($<0,01$) pour le facteur température et pas du tout significatif ($>0,05$) concernant le facteur temps d'incubation. Les valeurs p inhérentes des effets des interactions sont hautement significatives ($<0,01$) pour les facteurs concentration en NaOH/temps d'incubation et concentration en NaOH/température tandis que l'effet de l'interaction pour les facteurs temps d'incubation/température est significative ($<0,05$) indiquant que les trois paramètres interagissent ensemble lors de la désacétylation de la chitine, au seuil statistique retenu.

Le test de Student, pour un seuil de signification de 5% et pour un ddl = 12 ($ddl = n - k - 1 = 16 - 3 - 1 = 12$), donne une valeur t théorique de 2,179. Celle-ci est inférieure aux valeurs absolues t calculées de l'effet linéaire et quadratique de la concentration NaOH, de l'effet linéaire de temps d'incubation et quadratique de la température ainsi qu'aux valeurs des effets des interactions entre ces facteurs. Ceci signifie que les effets des facteurs temps d'incubation et concentration sont plus significatifs sur le DD de la chitine contrairement au facteur température car la même valeur s'avère supérieure aux valeurs t calculées de ce paramètre ce qui signifie que l'effet de ce dernier n'est pas significatif sur le DD dans la gamme étudiée.

Tableau IX : Résultats de l'analyse statistique des effets des facteurs sur le degré de désacétylation de la crevette rouge *Aristeus antennatus* (RISSO, 1816) (L : linéaire ; Q : quadratique ; t : valeurs obtenues par test de student).

Facteur	Effet	Probabilité (p)	Coefficient	t
Constante	25,86507	0,001227	25,86507	518,822
Concentration en NaOH (L)	6,85617	0,003553	3,42808	179,160
Concentration en NaOH (Q)	2,45628	0,012041	1,22814	52,865
Temps d'incubation (L)	8,35187	0,002917	4,17593	218,245
Temps d'incubation (Q)	-0,37922	0,077614	-0,18961	-8,162
Température (L)	-4,16194	0,005853	-2,08097	-108,757
Température (Q)	8,70710	0,003397	4,35355	187,396
Concentration en NaOH/ Temps d'incubation	7,62000	0,004177	3,81000	152,400
Concentration en NaOH/ Température	7,49000	0,004250	3,74500	142,800
Temps d'incubation/ Température	1,04000	0,030583	0,52000	20,800

2-4-3-Modélisation de la désacétylation de la chitine

L'exploitation des coefficients associés à l'ensemble des effets a permis d'élaborer un modèle du second degré susceptible de décrire l'étape de désacétylation de la chitine de carapace de crevettes rouges *Aristeus antennatus* (RISSO, 1816) :

$$Y=25,86507 + 3,42808X_1 + 1,22814 X_1^2 + 4,17593X_2 - 0,18961X_2^2 - 2,08097X_3 + 4,35355X_3^2 + 3,81000X_1X_2 + 3,74500X_1X_3 + 0,52000X_2X_3 \quad (8)$$

Avec :

Y : Représente la réponse mesurée au cours de l'expérience (DD) ;

X₁ : Niveau attribué au facteur concentration en NaOH ;

X₂ : Niveau attribué au facteur temps d'incubation ;

X₃ : Niveau attribué au facteur température.

Les valeurs des effets standardisés des facteurs étudiés sur le DD sont présentées dans le diagramme Pareto (Figure 17). Nous remarquons que le facteur temps d'incubation s'avère le facteur le plus influant sur le DD avec un effet linéaire standardisé positif de 218,244. Ceci signifie qu'en moyenne, le degré de désacétylation augmente de 8,35% lorsqu'on passe d'un temps de 80 à 370 min avec $p=0,0029$. Aussi, le facteur concentration en NaOH a un effet linéaire standardisé positif de 179,16. Ceci signifie que le DD augmente de 6,85% en passant d'une concentration de 0,03 à 2,5 M avec $p=0,0035$. Le facteur température, quant à lui, a démontré un effet standardisé négatif de -108,757. Cela signifie qu'en moyenne, le DD augmente de 4,16% en passant d'une température de 14 à 47 °C avec $p=0,0058$.

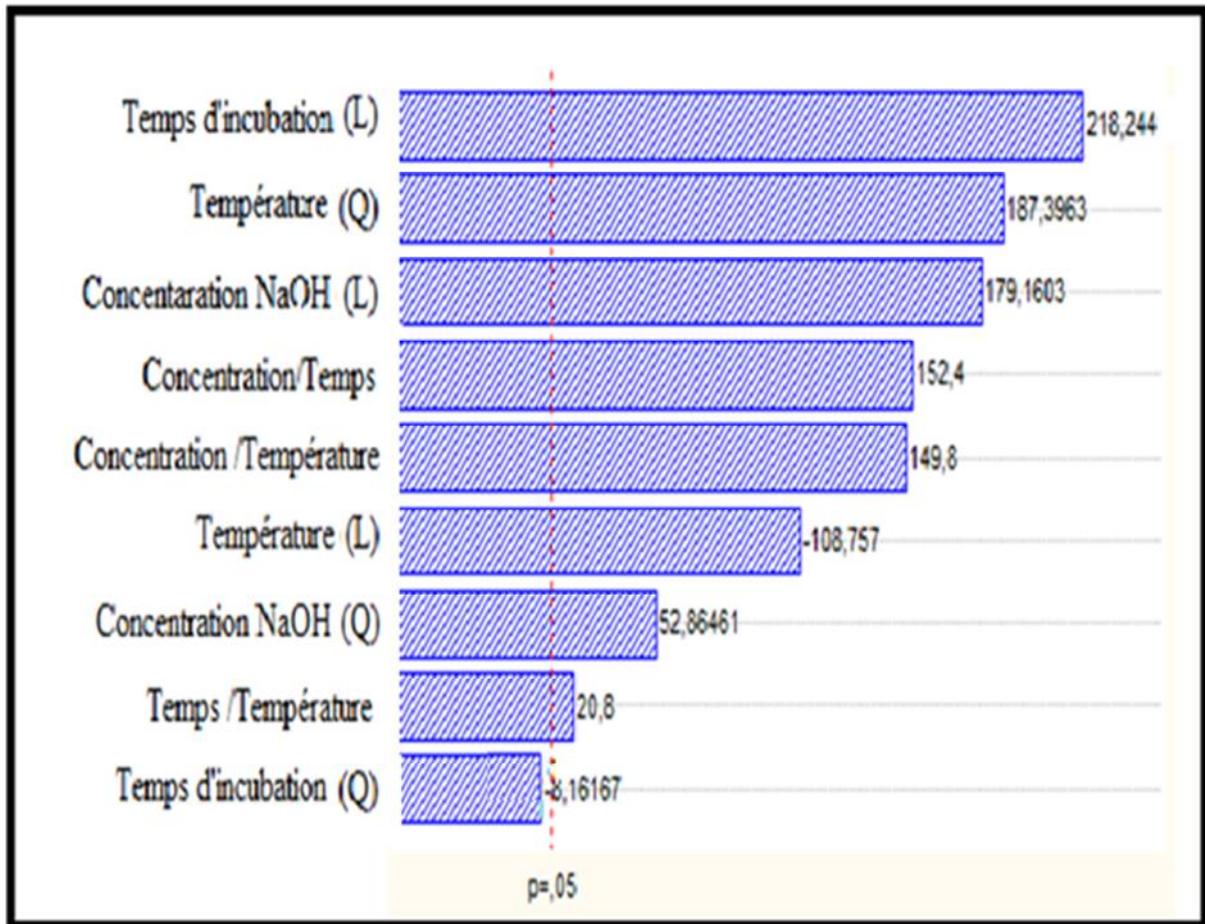


Figure 17 : Diagramme de PARETO des effets standardisés des facteurs étudiés sur le DD.

D'autre part, les effets quadratiques standardisés de la température et de la concentration en NaOH s'avèrent positifs et significatifs ; ils sont de l'ordre de 187,3963 et 52,86, respectivement. Par contre, l'effet quadratique standardisé du temps d'incubation s'est révélé non significatif.

L'effet standardisé de l'interaction concentration en NaOH/temps est de l'ordre de 152,4 avec $p < 0,01$. Cela signifie que le degré de désacétylation augmente de 7,62% lorsqu'on passe d'un niveau minimal à un niveau maximal (0,03 à 2,5M ; 80 à 370 min ; 14 à 47 °C).

L'effet standardisé de l'interaction concentration en NaOH/température est de l'ordre de 149,8 avec $p < 0,01$. Cela signifie que le degré de désacétylation augmente de 7,49% lorsqu'on passe d'un niveau minimal à un niveau maximal (0,03 à 2,5M ; 80 à 370 min ; 14 à 47 °C).

L'effet standardisé de l'interaction temps/température s'avère le plus faible (20,8%), indiquant que le DD augmente seulement de 1% lorsque on passe d'un niveau minimal à un niveau maximal (0,03 à 2,5M ; 80 à 370 min ; 14 à 47 °C).

De nombreux travaux ont été faits dans le but de préparer du chitosane. En accord avec la présente étude, Truong *et al.* (2007) ont indiqué que le facteur temps a une influence significative sur le DD car l'analyse des résultats a démontré que le meilleur degré de désacétylation (80%) a pu être obtenu après 60 min, pour différentes concentrations en NaOH étudiées (8,75M, 10M, 11,25M et 12,5M). Cela est expliqué par le fait que le temps agit d'une part sur la diffusion de la solution alcaline à l'intérieur de la chitine et d'autre part sur l'énergie d'activation de la désacétylation. L'interaction concentration NaOH/temps s'est aussi avérée avoir une grande influence car, pour une concentration en NaOH plus faible (8,75 M), cette réaction est incomplète même après 3 h. Selon CHANG *et al.* (1997) et METHACANON *et al.* (2003), cette limite peut être expliquée par la cinétique de l'énergie d'activation de la réaction de désacétylation car les liaisons entre les groupements amine et acétyle ne sont pas complètement coupées si l'énergie d'activation n'est pas suffisante. Il a aussi été prouvé que la variation de la concentration en NaOH a une plus grande influence sur la vitesse de réaction de désacétylation que la température car pour la concentration de NaOH la plus faible étudiée par ces auteurs (7,5 M), le pourcentage de désacétylation augmente à partir d'environ 60°C, mais il reste faible même à 120°C et le produit obtenu reste majoritairement sous forme de chitine. Par contre, le DD augmente plus rapidement pour les concentrations de NaOH plus élevées (10 ou 12,5 M).

Une autre étude effectuée par Mohammed *et al.* (2012) ont démontré que le DD augmente avec l'augmentation de la concentration en NaOH. En effet, il est passé de 34% pour une concentration de NaOH à 25 %, à 64% pour une concentration de NaOH à 50 %. De même, il a été démontré que le DD augmente avec l'augmentation de la durée de la réaction de désacétylation. En effet, il est passé de 64% pour une durée de 2h, à 73% pour une durée de 10h.

2-4-4-Interprétation des représentations graphiques obtenues par la méthode de surfaces de réponses

Le tracé en trois dimensions obtenues par la méthode de surfaces de réponses est un graphique qui représente l'interaction entre les variables. Chaque tracé représente la variation de la réponse en fonction de la combinaison, des facteurs, pris deux à deux, tandis que l'autre

variable sera maintenue au niveau zéro. Il permet, ainsi, de localiser le niveau optimal de chaque variable (De lima, 2010).

2-4-4-1-Variation du DD en fonction de la concentration en NaOH et du temps d'incubation

La variation du DD en fonction de la concentration en NaOH et du temps d'incubation est représentée par la figure 18. Celle-ci montre que l'augmentation du DD suit l'augmentation de la concentration en NaOH et du temps d'incubation. Ceci est visualisé sur la figure par l'élévation de l'allure du plan et apparition d'une couleur brune (DD>60%) au sommet du plan, signifiant une interaction, entre les facteurs concentration en NaOH et temps d'incubation, qui influence positivement sur la désacétylation de la chitine.

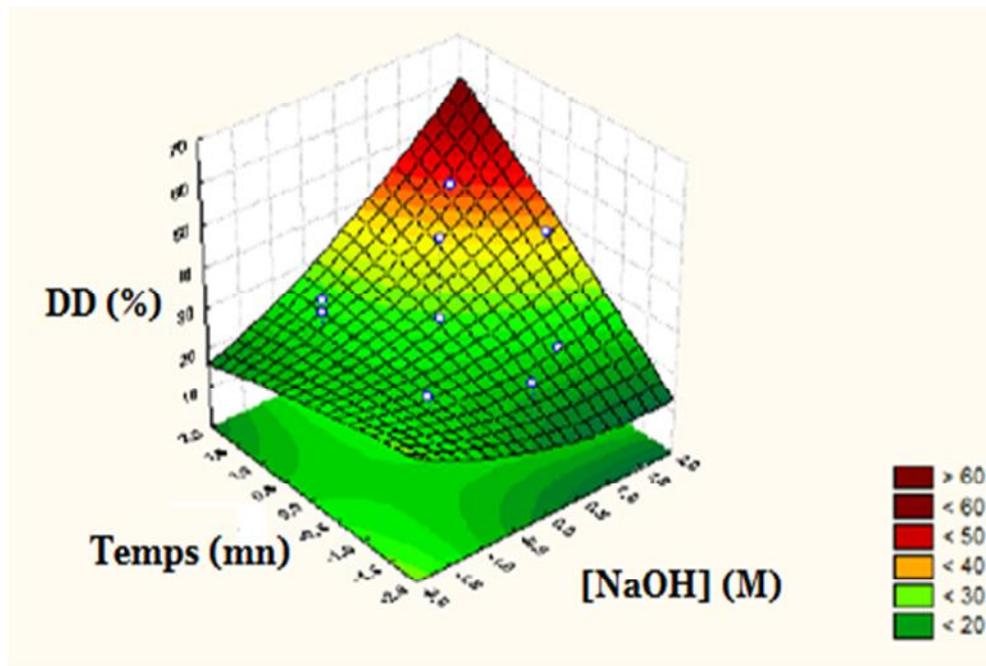


Figure 18 : Courbe de l'évolution du DD en fonction de la concentration en NaOH et du temps d'incubation

2-4-4-2-Variation du DD en fonction de la concentration en NaOH et de la température d'incubation

La variation du DD en fonction de la concentration en NaOH et de la température d'incubation est représentée par la figure 19. Il est à relever qu'il y a interaction entre les paramètres concentration en NaOH et température. En effet, lorsqu'il y a augmentation simultanée ou diminution simultanée de ces deux paramètres, le DD augmente. Ceci peut être visualisé par l'élévation de l'allure du plan faisant apparaître une couleur rouge à brune foncée caractéristique d'un DD > 60%.

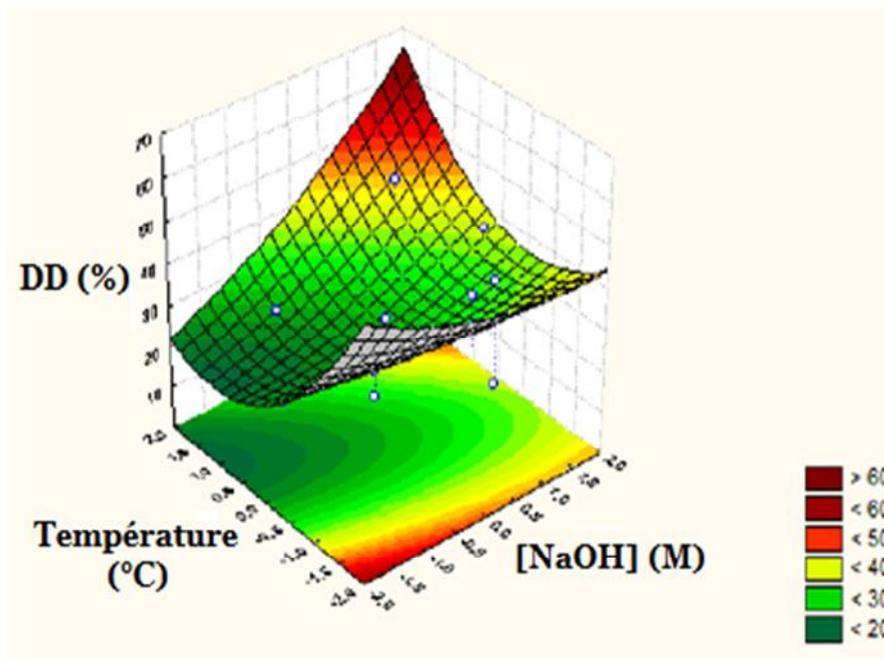


Figure 19 : Courbe de l'évolution du DD en fonction de la concentration en NaOH et de la température d'incubation.

2-4-4-3-Variation du DD en fonction du temps et de la température d'incubation

D'après la figure 20, on remarque qu'il y a interaction entre le facteur température et le facteur temps. En effet, les plus hautes valeurs de DD (l'élévation de l'allure du plan avec apparition de la couleur brune foncée (>50%)) sont atteintes lorsque l'augmentation du facteur temps est accompagnée par la diminution du facteur température.

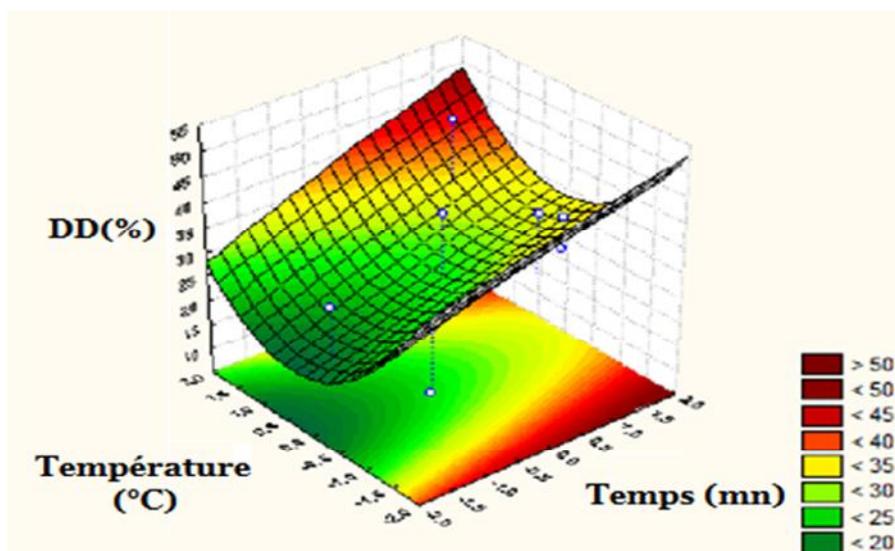


Figure 20 : Courbe de l'évolution du DD en fonction du temps et de la température d'incubation.

2-5- Optimisation de la désacétylation chimique de la chitine

En analysant les résultats précédemment cités, il paraît évident qu'il existe une interaction entre les trois facteurs étudiés. Nous nous sommes proposés de tester un point optimum suggéré par le logiciel Statistica release 7.0. Il s'agit de traiter la chitine (figure 21) avec une concentration de NaOH de 3,5 M à 5°C pendant 9 H et 40 min. Le produit ainsi obtenu (figure 22) a été soumis à une analyse FTIR afin de déterminer le DD.

Le spectre FTIR de ce produit est représenté par la figure 23. Le résultat de calcul du DD par application de l'équation de Domszy et Roberts (1985) (équation 6) est représenté dans le tableau X.



Figure 21 : Chitine avant désacétylation



Figure 22 : Chitosane optimisé

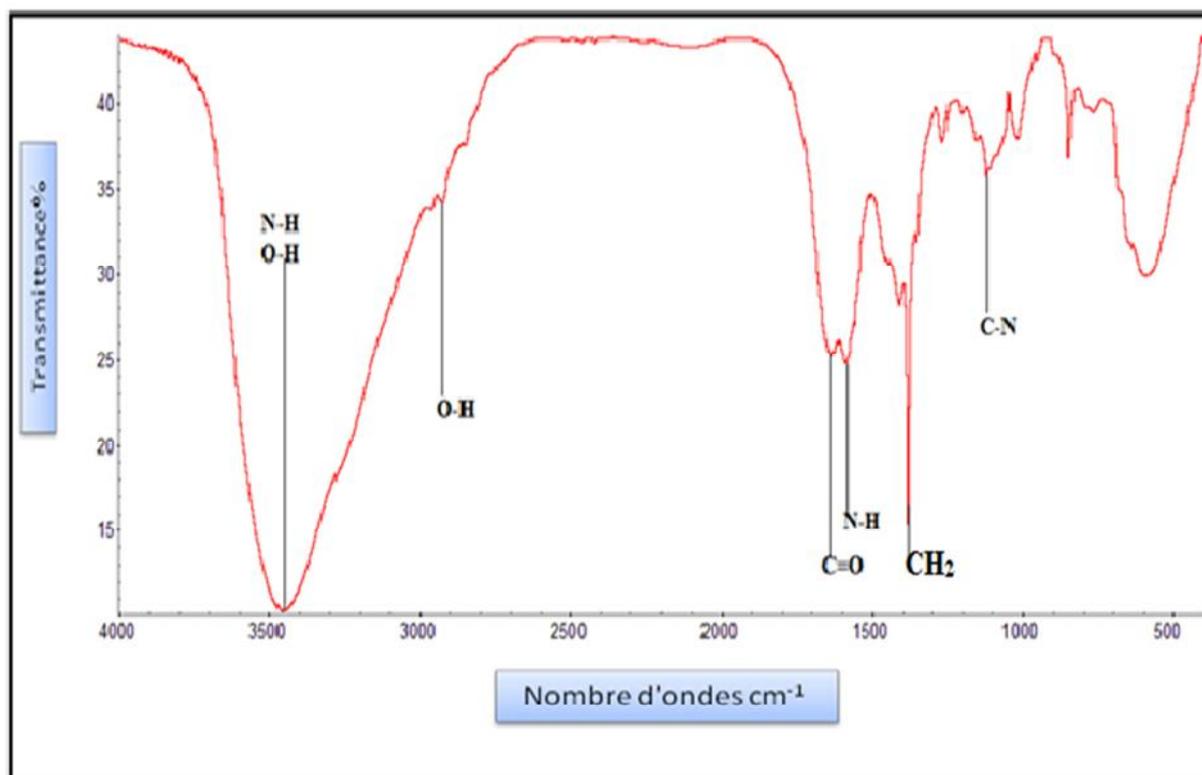


Figure 23 : Spectre FTIR du chitosane optimisé

Tableau X : Résultats du calcul du DD obtenu avec les paramètres optimaux.

T		A		DD (%)
1655 cm ⁻¹	3450 cm ⁻¹	1655 cm ⁻¹	3450 cm ⁻¹	
0,295	0,10	3,39	10	74,51

Il paraît clair que grâce aux conditions optimales utilisées suggérées par le logiciel Statistica release 7.0, nous sommes parvenus à préparer du chitosane avec un DD de 74,51 % à partir de la carapace de la crevette rouge *Aristeus antennatus* (RISSO, 1816).

Une étude faite par Truong *et al.* (2007) sur les carapaces de la crevette grise *Palaemonidae* a permis, après modélisations de la désacétylation en utilisant la méthode de surfaces de réponses, d'obtenir un chitosane avec un DD de 90%, en traitant les carapaces avec du NaOH à 12,5 M à 110 °C pendant 152 min. L'étude de Truong *et al.* (2007) a donc permis d'obtenir un chitosane avec un haut DD (90%) plus rapidement (152 min) mais avec des conditions drastiques (du NaOH à 12,5 M à 110 °C). Par contre, la présente étude a démontré qu'il est possible d'obtenir un chitosane de haut DD (74,51%) avec des conditions plus douces (NaOH à 3,5 M à 5°C pendant 9 H et 40 min).

Conclusion

Conclusion

L'objectif de notre travail est d'optimiser la préparation d'un biopolymère aux innombrables propriétés, nommé chitosane. Pour y aboutir, nous avons eu recours à la méthode de surfaces de réponses, qui permet en un nombre limité d'expériences d'avoir un maximum d'information sur les effets et les interactions des paramètres étudiés. Dans la présente étude, le chitosane était préparé à partir de la chitine extraite de la crevette rouge *Aristeus antennatus* (RISSO, 1816). Pour ce faire, la chitine a été désacétylée suivant les conditions données par la matrice du plan d'expériences pour surfaces de réponses. L'optimisation a porté sur trois conditions opératoires que sont la concentration initiale de NaOH, le temps et la température de réaction. Les résultats de l'optimisation ont permis d'obtenir un chitosane de DD appréciable (74,51%), et ce, dans les conditions optimales suivantes : NaOH à 3,5 M à 5°C pendant 9h et 40min. L'avantage d'utiliser des conditions douces est de permettre de réaliser une désacétylation tout en minimisant la baisse du poids moléculaire du polymère, due à la dépolymérisation qui a lieu en conditions de désacétylation drastiques.

En guise de perspectives, ce travail gagnerait à être approfondi par :

- la caractérisation du produit obtenu ;
- l'étude des propriétés du produit ainsi obtenu ;
- l'étude d'autres conditions optimisées douces afin de produire éventuellement un chitosane de plus haut DD ;
- l'essai de ce processus à l'échelle pilote ou semi-industrielle pour en déterminer la possibilité d'utilisation à l'échelle industrielle.

Références

bibliographiques

- ❖ Abd A.J., Niamah A.K. (2012). Effect of chitosan on apple juice quality. *International Journal of Agricultural and Food Science*. 2 (4), 153-157.
- ❖ Abdelkader Nassar M., El-Sakhawy M., Madkour H.M.F., El-ziaty A.K., Mohamed S.A. (2014). Novel coating of bagasse paper sheets by gelatin and chitosane. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*. 29 (4), 741-746.
- ❖ Austin P.R. (1984). Chitin solvents and solubility parameters in: *Chitin and chitosane and related enzymes*. Zikakis JP, ed. Orlando: Academic Press. 227.
- ❖ Bal Y., Bal K.E., Laarabi- Bouamrane O., Lallam A. (2006). Copper (II) uptake by *Pleurotus mutilus* biomass, chitin and chitosan. *Mineral Engineering*. 19 (14), 1456-1458.
- ❖ Benhabiles M.S., Salah R., Lounici H. , Drouiche N., Goosen M.F.A. , Mameri N. (2012). Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids*. 29 (1), 48-56.
- ❖ Berth G., Dautzenberg H., Peter M.G. (1998). Physico-chemical characterization chitosans varying in degree of acetylation. *Carbohydrate Polymers*. 36, 205-218.
- ❖ Benhamou N., Picard K. (1999). La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection*. 80(3), 137-168.
- ❖ Boonlertnirun S., Boonraung C., Suvanansara R. (2008). Application of Chitosan in Rice Production. *Journal of Metals, Materials and Minerals*. 18 (2), 47-52.
- ❖ Bouligand Y. (1972). Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases. *Tissue and Cell*. 4 (2), 189-217.
- ❖ Chang K.L.B., Tsai G., Lee J., Fu W.R. (1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Research*. 303(3), 327-332.
- ❖ Chang W-T., Yu-Chung C., Chia-Ling J. (2006). Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresource Technology*. 98 (6), 1224-1230.
- ❖ Chang H.-P., Yao H.-T., Chiang M.-T. (2012). Effects of High and Low Molecular Weight Chitosan on Plasma Cholesterol, Glucose and Adipocytokines in Diabetic Rats Induced by Streptozotocin and Nicotinamide. *Journal of Food and Drug Analysis*. 20(3), 661-667.
- ❖ Chatelet C., Damour O., Dmard A. (2001). Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosane films. *Biomaterials*. 22, 261-268.

- ❖ Chen R.H., Tsaih M.L. (1998). Effect of temperatures on the intrinsic viscosity and conformation of chitosan in dilute HCl solution. *International Journal of Biological Macromolecules*. 23,135-141.
- ❖ Crini G., Badot P.-M., Guibal E. (2009). *Chitine et chitosane: du biopolymère à l'application*. Presses Univ. Franche-Comté, ed. Amazon France.
- ❖ De Alvarenga E.S., de Oliveira C.P., Bellato C.R. (2010). An approach to understanding the deacetylation degree of chitosane. *Carbohydrate Polymers*. 80 (4), 1155-1160.
- ❖ De lima C.J.B., Coelho L.-F., Contiero J. (2010). The Use of Response Surface Methodology in Optimization of Lactic Acid Production: Focus on Medium Supplementation, Temperature and pH Control. *Food Technology and Biotechnology*. 48 (2), 175-181.
- ❖ Desbrières J. (2002). Chitine et chitosane : L'actualité Chimique. *Journal de la Société chimique de France*. 261. 39-44.
- ❖ Desbrières J., Bousquet C., Babak V. (2010). Surfactant-Chitosan interactions and application to emulsion stabilization. *Cellulose Chemistry and Technology*. 44 (9), 395-406.
- ❖ Dhadialla T.-S. (2012). *Insect Growth Disruptors*. Academic press of Elsevier, ed. Amazon France.
- ❖ Di Mario F., Rapan`a P., Tomati U., Galli E. (2007). Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *International Journal of Biological Macromolecules*. 43 (1), 8-12.
- ❖ Drosbeke J.-J., Fine J., Saporta G. (1997). *Plans d'expériences : Application à l'entreprise*. Technip, ed. Atlas Books, 528.
- ❖ Duval M., Olivier F. (2008). *Isolation et valorisation des constituants de la carapace de la crevette blanche*. Mémoire de maitre ès sciences (M.sc.). Université de Laval, Canada.
- ❖ Einbu A., Varum K.M. (2007). Depolymerization and de-N-acetylation of chitin oligomers in hydrochloric acid. *Biomacromolecules*. 8 (1), 309-314.
- ❖ Falini, G., Weiner, S., Addadi, L. (2003). Chitin-silk fibroin interactions: Relevance to calcium carbonate formation in invertebrates. *Calcified Tissue International*. 72, 548–554.
- ❖ Foscolo J., Phillipon P. (1997). Des molécules qui miment le vivant. *Biofutur*. 171, 14-17.

- ❖ Furuhashi T., Beran A., Blazso M., Czegeny Z., Schwarzinger C., Steiner G. (2009). Pyrolysis GC/MS and IR Spectroscopy in Chitin Analysis of Molluscan Shells. *Biosci. Biotechnology and Biochemistry*. 73 (1), 93-103.
- ❖ Gentilia Alejandro R., Cubitto M., Ferrerob M., Rodríguez Maria S. (2006). Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 57 (4), 222–228.
- ❖ Gomez-Guillen M.C., Montero P., Solas M.T., Perez-Mateos M. (2005). Effect of chitosan and microbial transglutaminase on the gelforming ability of horse mackerel (*Trachurus spp.*) muscle under high pressure. *Food Research International*. 38, 103-110.
- ❖ Gopal V., Prakash Y.G., Rose C., Rajashree S. (2015). Cosmeceuticals from pharmaceutical aids. *Acta Biomedica Scientia*. 2 (2), 68-72.
- ❖ Goupy J. (2006). Tutorial, les plans d'expériences. *Revue MODULAD*. 34, 74-116.
- ❖ Huang X.-J., Ge D., Xu Z.-K. (2007). Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *European Polymer Journal*. 43, 3710–3718.
- ❖ Hundson S.M., Jenkins D.W. (2003). *Chitin and chitosane*. Mark HF (ed), EPST, Vol 1, Wiley, New York. 569.
- ❖ Jaworska M.M., Konieczna E.(2001). The influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by the fungus *Absidia orchidis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56 (1-2), 220-224.
- ❖ Jaworska M., Sakurai K., Gaudon P., Guibal E. (2003). Influence of chitosan characteristics on polymer properties I: Crystallographic properties. *Polymer International*. 52 (2), 198-205.
- ❖ Jayakumar R., Nwe N., Tohura S., Tamura H. (2006). Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *International Journal of biological macromolecule*. 40 (3), 175-181.
- ❖ Jerome J.P., James T.S., Stephen L. (2004). *Microbiologie : Cours et questions de révisions*. Dunod, Paris.
- ❖ Jung W.J., Jo G.H., Kuk J.H., Kim K.Y., Park R.D. (2005). Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei subsp.*

- Tolerans KCTC-3074 and Serratia marcescens FS-3. Applied Microbiology and Biotechnology.* 71 (2), 234-237.
- ❖ Kafetzopoulos D., Martinou A., Bouriotis V. (1993). Bioconversion of Chitin to Chitosan-Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proceedings of National Academy of Sciences of the U.S.A.* 90 (7), 2564-2568.
 - ❖ Kalia S., Avérous L. (2011). *Biopolymers: Biomedical and Environmental Applications*. Wiley & Sons, Inc. Hoboken ed, New jersey.
 - ❖ Kamil J.Y.V.A., Jeon Y.-j., Shahidi F. (2002). Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*). *Food Chemistry.* 79, 69-77.
 - ❖ Kaplan D.L. (1998). *Biopolymers from Renewable Resources*. Macromolecular systems, Dr Kaplan ed, Madford (USA).
 - ❖ Kasai M.R.(2009). Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 57 (5), 1667-1676.
 - ❖ Khor E. (2001). *Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise*. Chiticore Enterprises Inc., Victoria, BC, Canada.
 - ❖ Kim S.-K., Nghiep N.-D., Rajapakse N. (2006). Therapeutic prospective of chitin, chitosane and their derivatives, *Journal bioprocess research center.* 11 (1), 1-10.
 - ❖ Koide S. (1998). Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. *Nutrition Research.* 18 (6), 1091-1101.
 - ❖ Kumar M.N.V.R. (2000). A review of chitin and chitosane applications. *Reactive & Functional Polymers.* 46, 1-27.
 - ❖ Kumirska J., Weinhold M.X., Sauvageau J.C.M., Thoming J., Kaczynski Z., Stepnowski P. (2010). Determination of the pattern of acetylation of low-molecular-weight chitosan used in biomedical applications. *Journal of Pharmaceutica Biomedical Analysis.* 50 (4), 587-590.
 - ❖ Kurita K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science.* 26 (9), 1921-1971.
 - ❖ Kurita K. (2006). Chitin and chitosan from marine crustaceans: Functional biopolymers. *Mini-review Marine Biotechnology.* 8 (3), 203-226.
 - ❖ Lamarque G., Viton C., Domard A. (2004). Comparative study of the second and third heterogeneous deacetylations of alpha- and beta-chitins in a multistep process. *Biomacromolecules,* 5 (5), 1899-1907.

- ❖ Lavall R.L., Assis O.B.G., Sérgio P., Campana-Filho S P. (2007). β Chitin from the pens of *Loligo sp* : Extraction and characterization. *Bioresource Technology*. 98 (13), 2465-2472.
- ❖ Lee H.-W., Park Y.-S., Jung J.-S., Shin W.-S. (2002). Chitosan oligosaccharides, dp 2-8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus sp*. *Anaerobe Journal Impact Factor on research*. 8 (6), 319-24.
- ❖ Le nardon M.D., Munro C.A., Gow N.A.R. (2010). Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Current opinion in Microbiology*. 13, 416-423.
- ❖ Le Roux K. (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 en Biochimie et biotechnologie des produits marins, université de Nantes, France.
- ❖ Le Saout G (2008). Etude de matériaux cimentaires par diffraction des rayons X : Travaux pratique de matériaux de construction. Institut des matériaux. École polytechnique fédérale de Lausanne, suisse.
- ❖ Majtán J., Bíliková K., Markovič O., Gróf J., Kogan G., Simúrth J. (2007). Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*). *International Journal of Biological Macromolecules*. 40 (3), 237-241.
- ❖ Manisara P., Ratana R., Pitt S. (2003). Characterisation of beta- chitin/ poly (vinyl alcohol) blend films. *Polymer testing*. 22, 381- 387.
- ❖ Martinou A., Bouriotis V., Stokke B.T., Varum K.M. (1998). Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on partiality N-acetylated chitosans. *Carbohydrate Research*. 311 (1-2), 71-78.
- ❖ Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V. (1995). Chitin Deacetylation by Enzymatic Means-Monitoring of Deacetylation process. *Carbohydrate Research*. 273 (2), 235-242.
- ❖ Merzendorfer H. (2006). Insect chitine synthase. *Journal of comparative physiology B*. 176 (1), 1-15.
- ❖ Methacanon P., Prasitsilp M., Pothsree T., Pattaraarchachai J. (2003). Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Polymers*. 52, 119-123.

- ❖ Mignotte O., Herin P., Bihan A., Randria C., Talneau Y. (2012). Dépolluer une eau avec des carapaces de crevettes. Pas si complexe. *Union des professeurs de physique et de chimie*. 106 (940), 43-44.
- ❖ Mohammed M.-H., Williams P.-A., Tverezovskaya O. (2012). Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosane. *Food Hydrocolloids*.31, 166-171.
- ❖ Mokrani N. (2013). Préparation et étude du comportement de membranes bio polymère Alginate de sodium/chitosane. Mémoire de Magistère en Chimie physique des polymères, université de M'hamed Bouguera de Boumerdès.
- ❖ Morimoto M., Saimoto H., Yoshihiro S. (2002). Control of functions of chitin and chitosan by chemical modification. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. 14 (78), 205- 222.
- ❖ Mrunal RT. (2004). Synthesis and antibacterial assessment of water- soluble hydrophobic chitosan derivatives bearing quaternary ammonium functionality. Thèse de doctorat en chimie , université de Louisiana, Inde.
- ❖ Muzzarelli C., Francescangeli O., Tosi G., Muzzarelli R.A.A. (2004). Susceptibility of dibutyl chitin and regenerated chitin fibers to deacetylation and depolymerization by lipases. *Carbohydrate Polymers*.56. 137-146.
- ❖ Nugraha E.S. (2006). Développement de films biodégradables à base de chitosane. Etude de mélange chitosane. Thèse de doctorat en chimie des matériaux, Université de Reims, France.
- ❖ Onsoyen E., Skaugrud O. (1990). Metal recovery using chitosane. *Journal of chemical Technology and biotechnology*. 49 (4), 395-404.
- ❖ Patil R.S., Ghormade V., Deshpande M.V. (2000). Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*. 26 (7), 473-483.
- ❖ Paulino A.T., Simionato J.I., Garcia J.C., Nozaki J. (2006). Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. *Carbohydrate Polymers*. 64 (1), 98-103.
- ❖ Percot A., Viton C., Domard A. (2003). Optimization of chitin extraction from shrimps shells. *Biomacromolecules*. 4(1), 12-18.
- ❖ Raabe D., Sachs C., Romano P. (2005). The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material. *Acta Materialia*. 53(15). 4281-4292.

- ❖ Ramadan M.A.E., Samy S., abduhady M., Ali Hebeish A. (2011). *Eco-Friendly Pretreatment of Cellulosic Fabrics with Chitosan and Its Influence on Dyeing Efficiency*. In Tech. Dr. Emriye Akcakoca Kumbasar (Ed.). Hotel Equatorial Shanghai (China).
- ❖ Ramírez-Coutiño L., Marín-Cervantes M.D.C., Huerta S., Revah S., Shirai K. (2006). Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry*. 41(5).1106-1110.
- ❖ Rao M.S., Stevens W.F. (2006). Fermentation of shrimp biowaste under different salt concentrations with amylolytic and non-amylolytic *Lactobacillus* strains for chitin production. *Food Technology and Biotechnology*. 44 (1), 83-87.
- ❖ Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 62 (3), 597-635.
- ❖ Rhazi M., Desbrieres I., Tolaimate A., Rinaudo M., Vottera P., Alagui A., El Meray M. (2002). Influence of the nature of the metal ions on the complexation with chitosane: Application to the treatment of liquid waste. *European Polymer Journal*.38, 1523-1530.
- ❖ Rinaudo M. (2006). Chitin and chitosan : Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 31(7), 603-632.
- ❖ Rinaudo M. (2008).Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*. 57 (3), 397-430.
- ❖ Roberts G.A.F. (1992). Structure of chitin and chitosane. In: *Chitin chemistry*, edited by Roberts G.A.F, Mac Millan Press, Houndmills. 1-53.
- ❖ Sebti I., Martial-Gros A., Carnet-Pantiez A., Grelier S., Coma V. (2006). Chitosan Polymer as Bioactive Coating and Film against *Aspergillus niger* Contamination. *Journal of Food Science*.70 (2), 100-104.
- ❖ Shahidi F., Abouzaytoun R. (2005). Chitin, chitosane, and co-products: chemistry, productions, applications, and health effects. *Advances in food and Nutrition research*. 49, 93-135.
- ❖ Shi C., Zhu Y., Ran X., Wang M., Su Y., Cheng T. (2006). Therapeutic potential of chitosane and its derivatives in regenerative medicine. *Journal of Surgical Research*.133 (2), 185-192.

- ❖ Simon P., Chevalier V. (2000). Composition anti-rides comprenant une association de polymères tenseurs d'origine synthétique et/ou naturelle et de polyesters dendritiques. *Brevet canadien N°CA2281999 A1*. Bibtex. CANADA.
- ❖ Simunek J., Bartonova H. (2005). Effect of Dietary Chitin and Chitosan on Cholesterolemia of Rats. *Journal Acta Veterinaria Brunensis*. 74, 491-499.
- ❖ Synowiecki J, Al-Khateeb N.A. (2003). Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* .43 (2), 145-171.
- ❖ Tayeb H. (2013). Acetate de cellulose ,Synthese, Propriétés et Applications. Mémoire de Master en chimie Macromoléculaire, université de Tlemcen, Algérie.
- ❖ Teng W.L., Khor E., Tan T.K., Lim L.Y., Tan S.C. (2001). Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydrate Research*. 332 (3), 305-316.
- ❖ Tikhonov V.E., Stepnova E.A., Babak V.G., Yamskov I.A., Palma-Guerrero J., Jansson H.-B., Lopez-Llorca L.V., Salinas J., Gerasimenko D.V., Avdienko I.D., Varlamov V.P. (2006). Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-2(3)-(dodec-2-enyl) succinoyl/-derivatives. *Carbohydrate Polymers*. 64, 66–72.
- ❖ Tokura S., Tamura H. (2007). Chitin and Chitosan. In: *Comprehensive Glycoscience*. Edited by Johannes PK. Oxford: Elsevier.
- ❖ Tolaimate A., Desbrieres J., Rhazi M., Alagui A. (2003). Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polym*. 44, 7939-7952.
- ❖ Truong T.-O., Hausler R., Monette F., Niquette P. (2007). Valorisation des résidus industriels de pêches pour la transformation de chitosane par technique hydrothermo-chimique. *Revue des sciences de l'eau*. 20 (3), 253-262.
- ❖ Tsai G.J., Su W.H., Chen H.C., Pan C.L. (2002). Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosane from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science*. 68(1), 170-177.
- ❖ Tsigos I., Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V. (2000). Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Foundation of Research and technology*. 18, 305-310.
- ❖ Wan J., Zhang X.-C., Stacey G. (2008). Chitin signaling and plant disease resistance. *Plant Signaling and Behaviour*. 3 (10). 831–833.

- ❖ Wang S.L., Chio S.H. (1998). Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187. *Enzyme and Microbial Technology*. 22 (7), 629-633.
- ❖ Xiong C. (2010). Adsorption of Cadmium. *Journal of Chemical Society of Pakistan*. 32(4),429-435.
- ❖ Yang Y.- P., Xu X.- H., Chen H.- F. (2004). Treatment of chitin-producing wastewater by micro- electrolysis- contact oxidization. *Journal of Zhejiang University Science*, 5 (4), 436- 440.
- ❖ Yang L., Zaharoff D.A. (2013). Role of chitosan co-formulation in enhancing interleukin-12 delivery and antitumor activity. *Biomaterials*. 4 (15), 3828-3836.
- ❖ Yen M.-T., Tseng Y.H., Mau J.-L. (2007). Antioxydant properties of fungal chitosan from shiitake stipes. *Food Science and Technology*. 40, 472-479.
- ❖ Zhang H., Li R., Liu W. (2011). Effects of Chitin and Its Derivative Chitosan on Postharvest Decay of Fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (2), 917-934.

Webliographie:

- ❖ Biophysique research. (2012). La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier. <http://www.biophyresearch.com/technique-analyse/la-spectroscopie-infrarouge-a-transformee-de-fourier/>.
- ❖ Bouquelet S. (2008). Polysaccharides alimentaires [Photographie] Tiré de <http://biochim-agro.univ-lille1.fr/polysaccharides/co/polysaccharides.html>.
- ❖ FAO. (2014). The state of world fisheries and aquaculture. In. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 83-86. tiré de <http://www.fao.org/>.
- ❖ FAO: SOFIA. (2012). The state of world fisheries and aquaculture. In. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 230. Tiré de <http://www.fao.org/>.
- ❖ FAO: SOFIA. (2014). The state of world fisheries and aquaculture. In. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 230. Tiré de <http://www.fao.org/>.
- ❖ Ifremer. Chitine et chitosane. (2010). *Bibliomer*. 1, 1-3. Tiré de http://www.bibliomer.com/documents/fiches/Chitine_et_chitosan_vf.pdf.

- ❖ Rioux M. (2008). Planification et optimisation d'expériences. Chapitre 10- Méthodes et plans de surfaces de réponses -[Présentation PowerPoint]- Tiré de <https://cours.etsmtl.ca/gol675/Cours/ch10.pdf>.
- ❖ Savary A., Gendre L., & Soulier B. (2009). Les plans d'expériences. Science de l'ingénieur. Tiré de <http://www.si.enscachan.fr/>.

Annexes

Annexe 1 : Spectres infrarouges

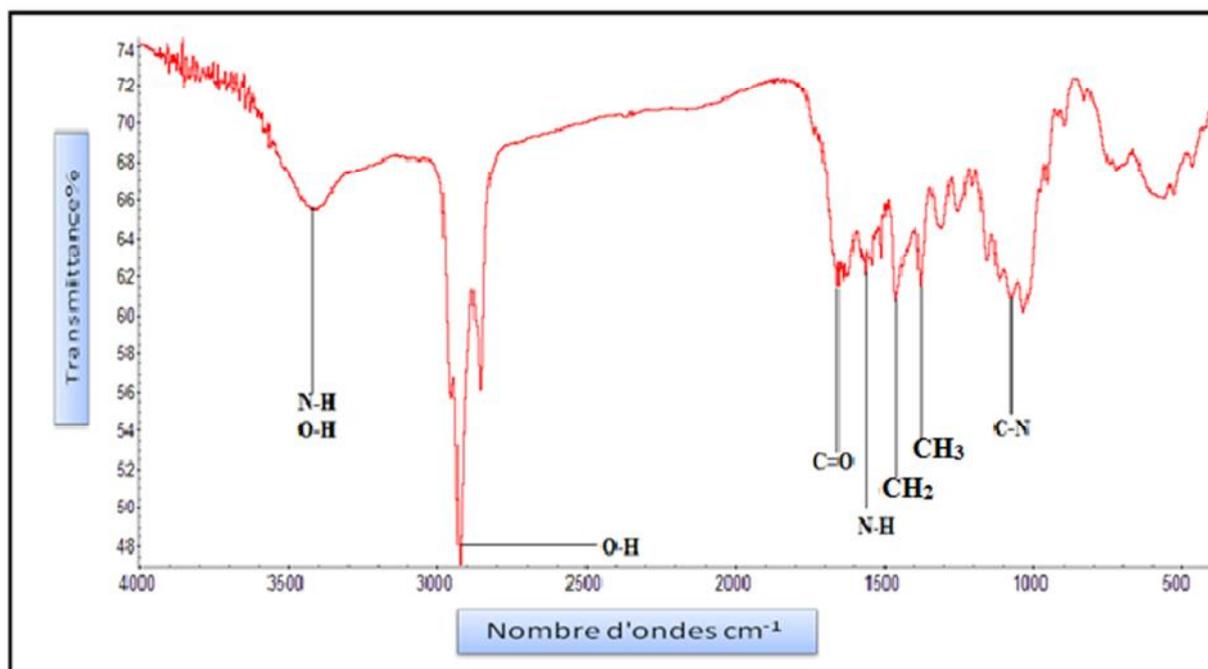


Figure 24 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°2

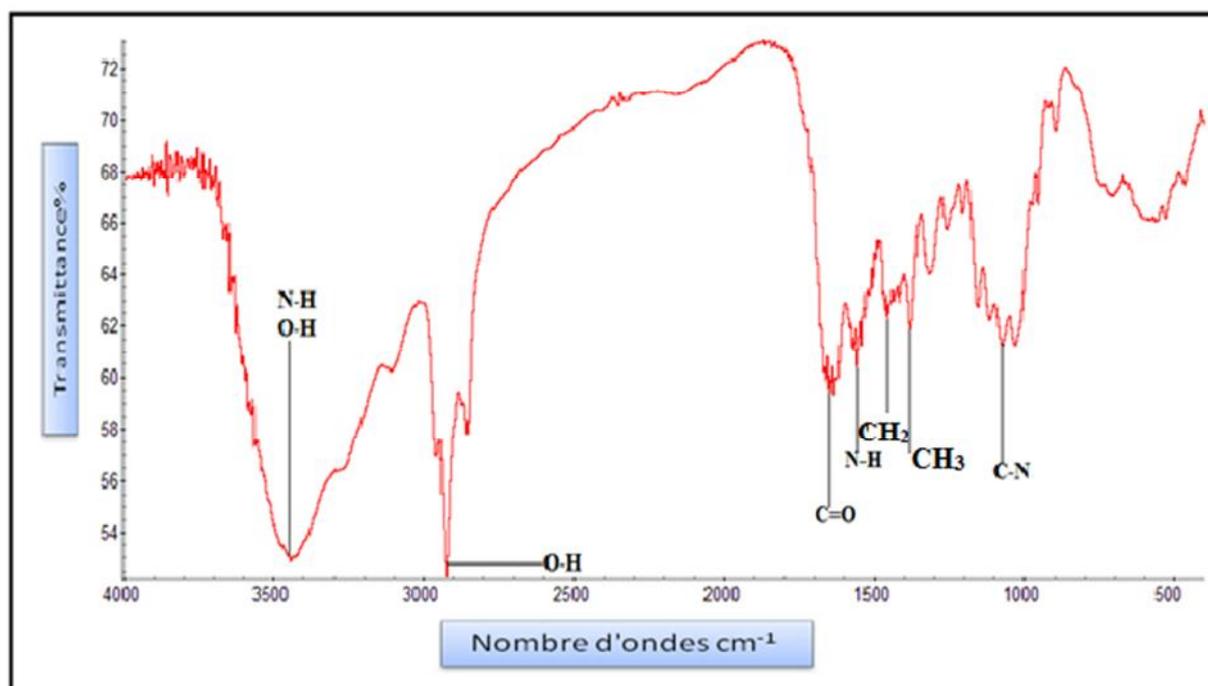


Figure 25 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°3

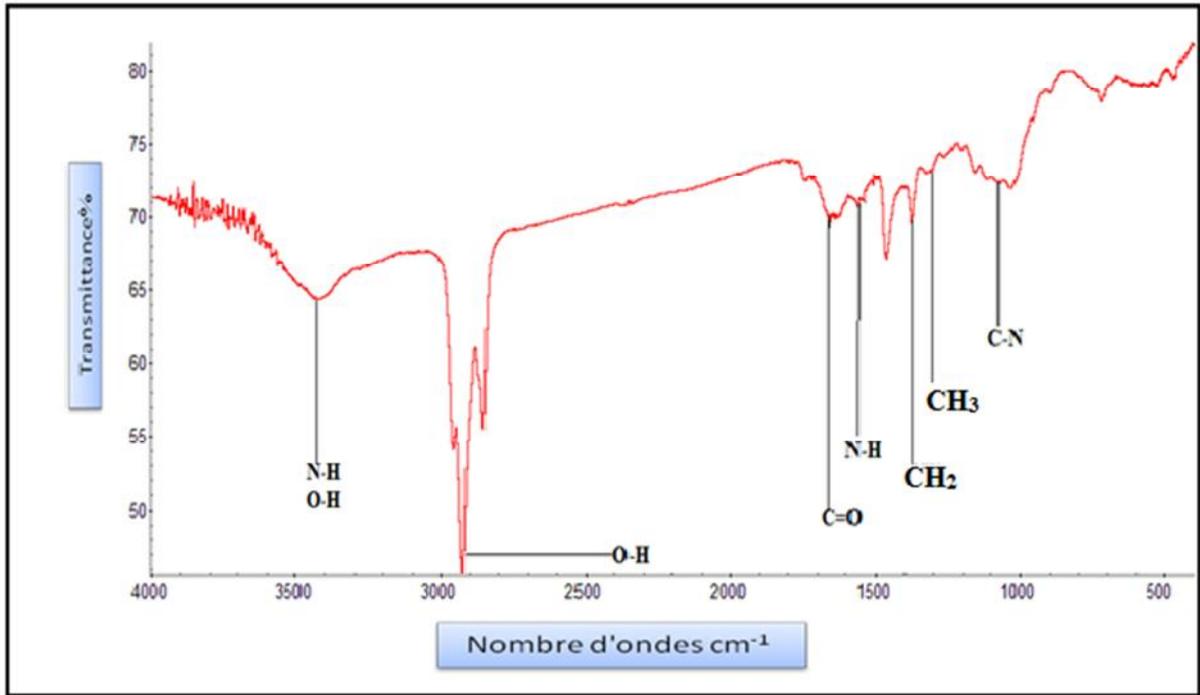


Figure 26: Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°4

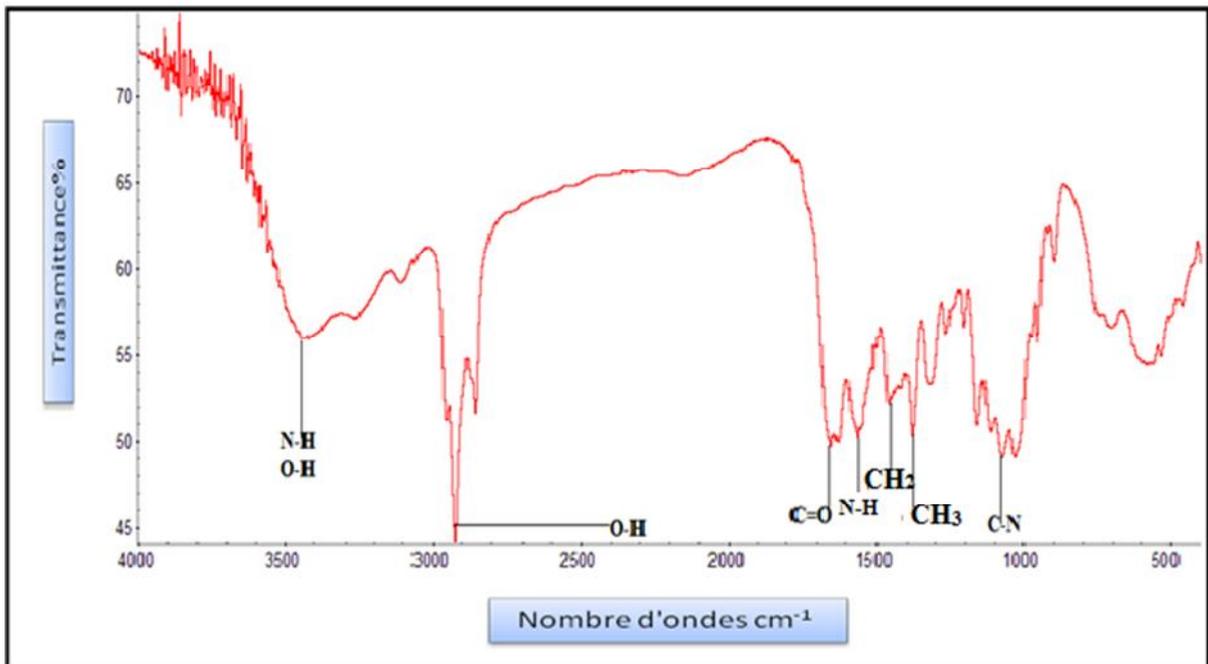


Figure 27 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°5

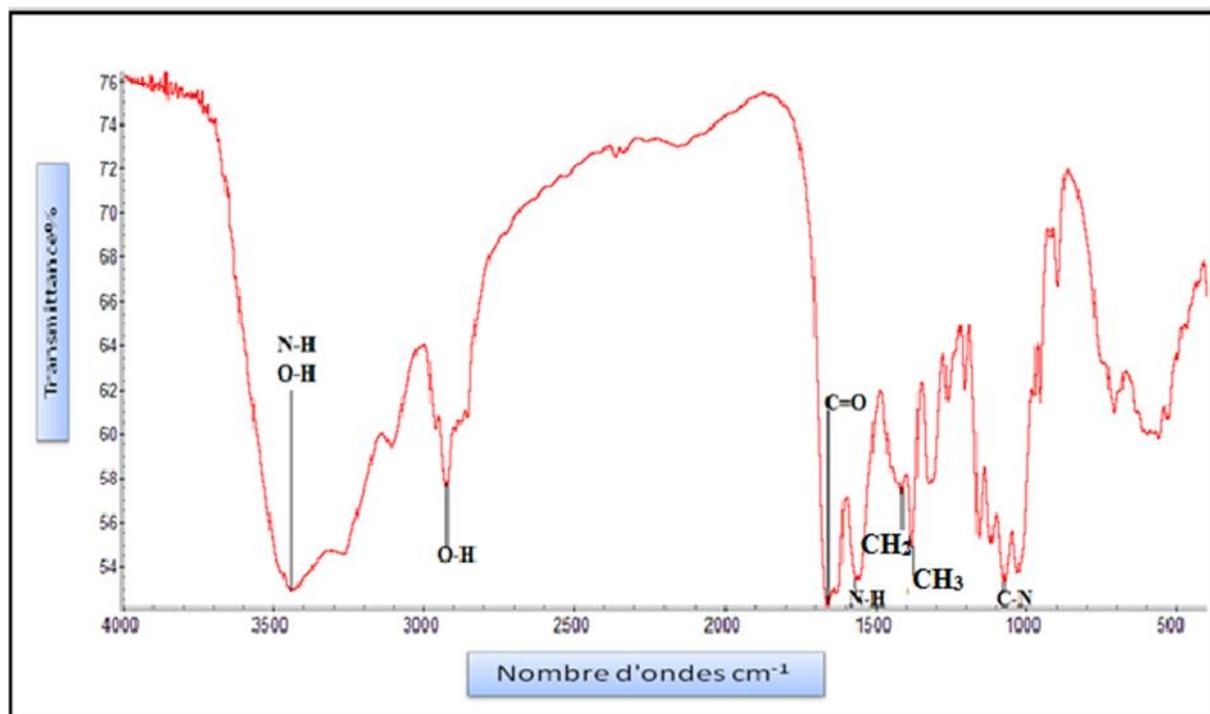


Figure 28 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°6

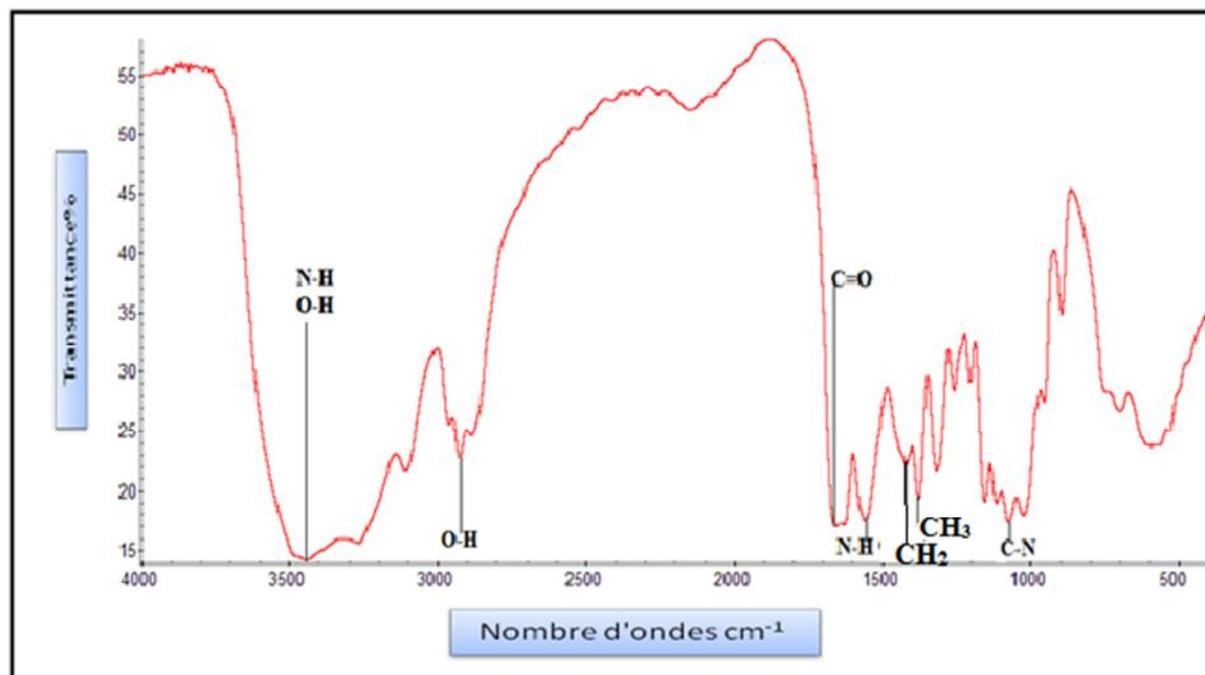


Figure 29 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°7

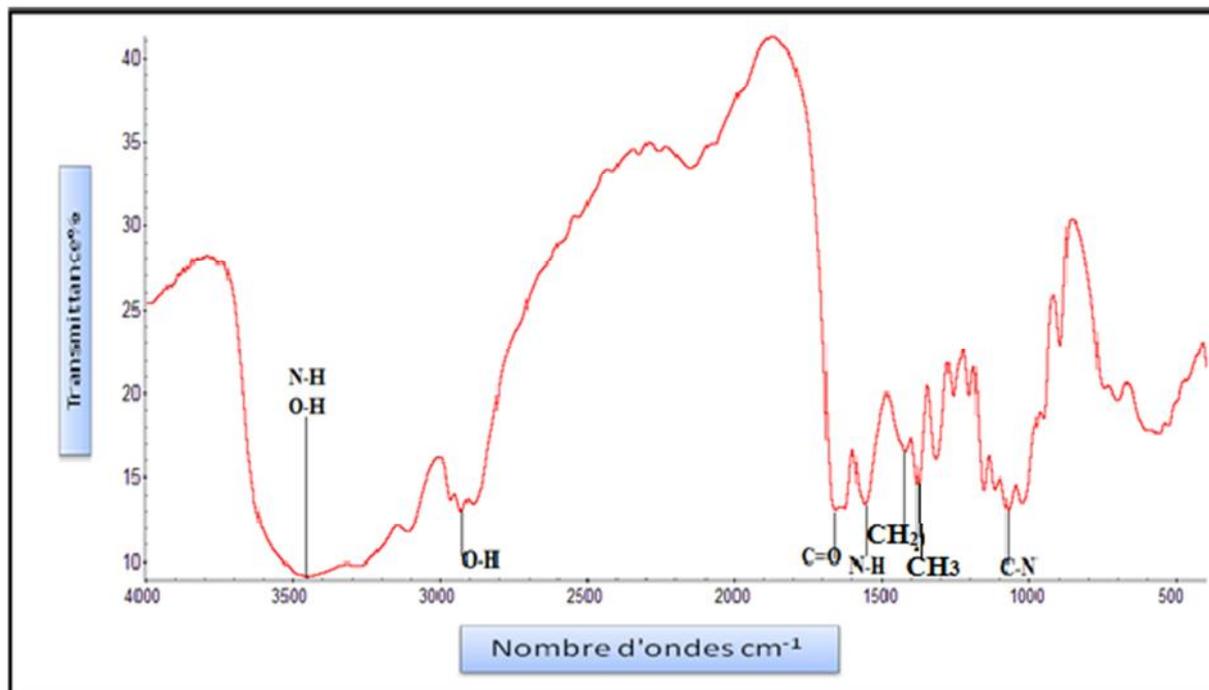


Figure 30 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°8

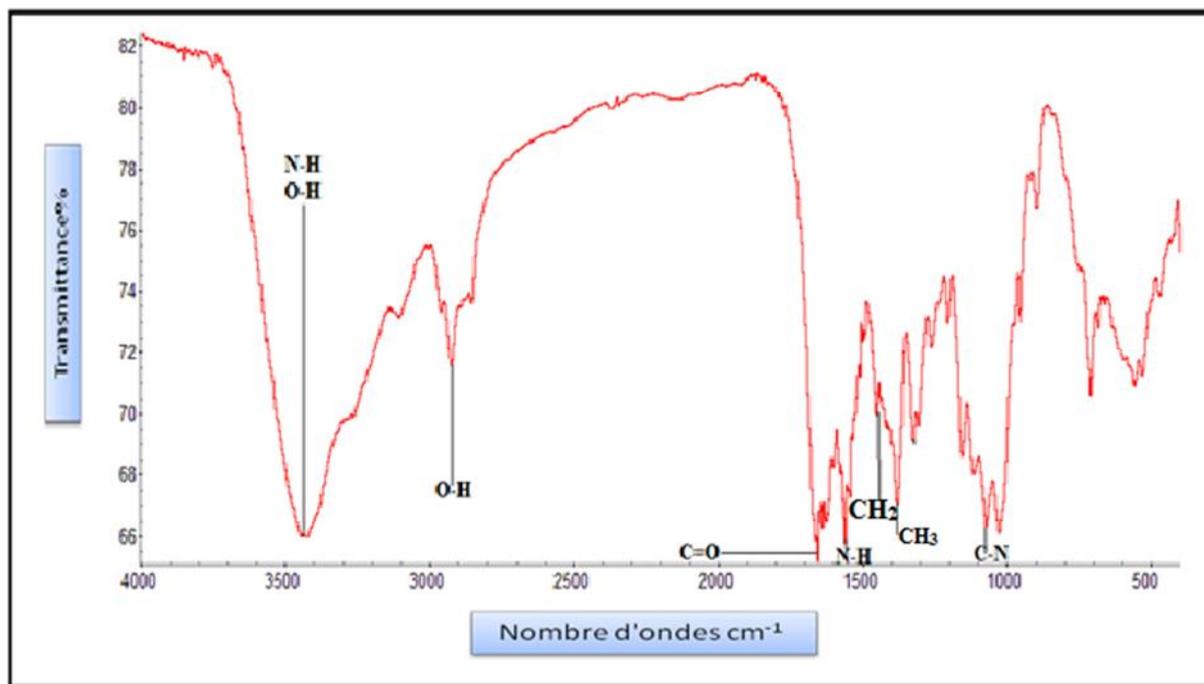


Figure 31: Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°9

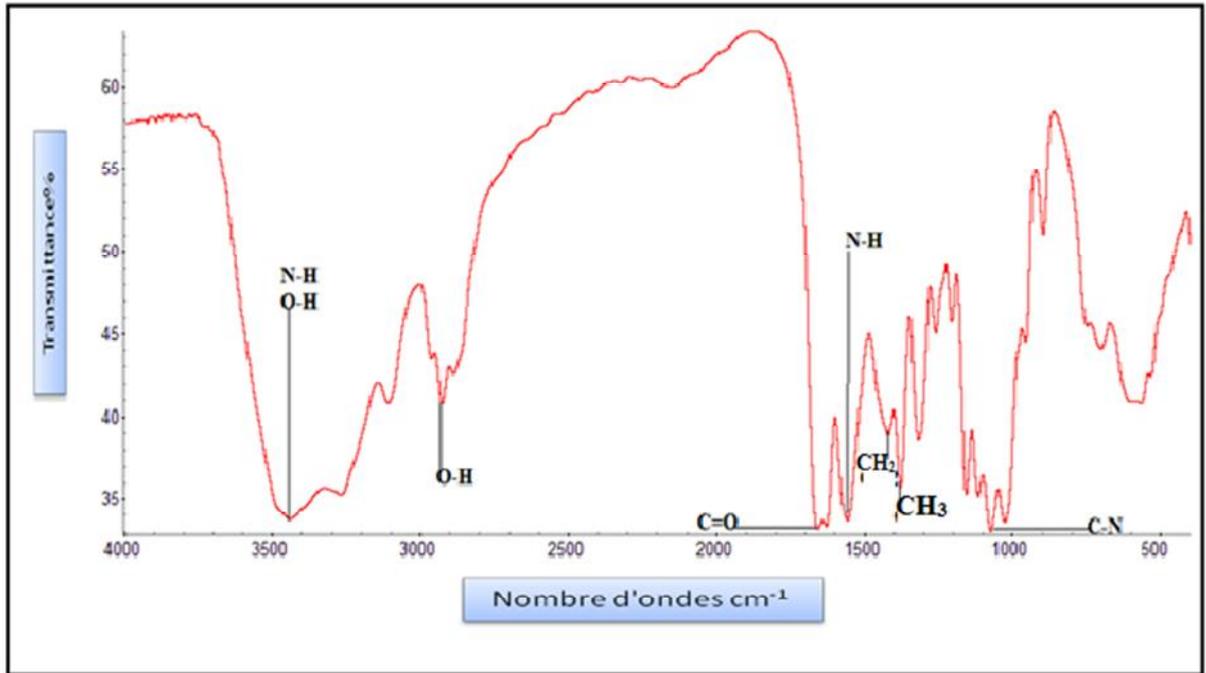


Figure 32: Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°10

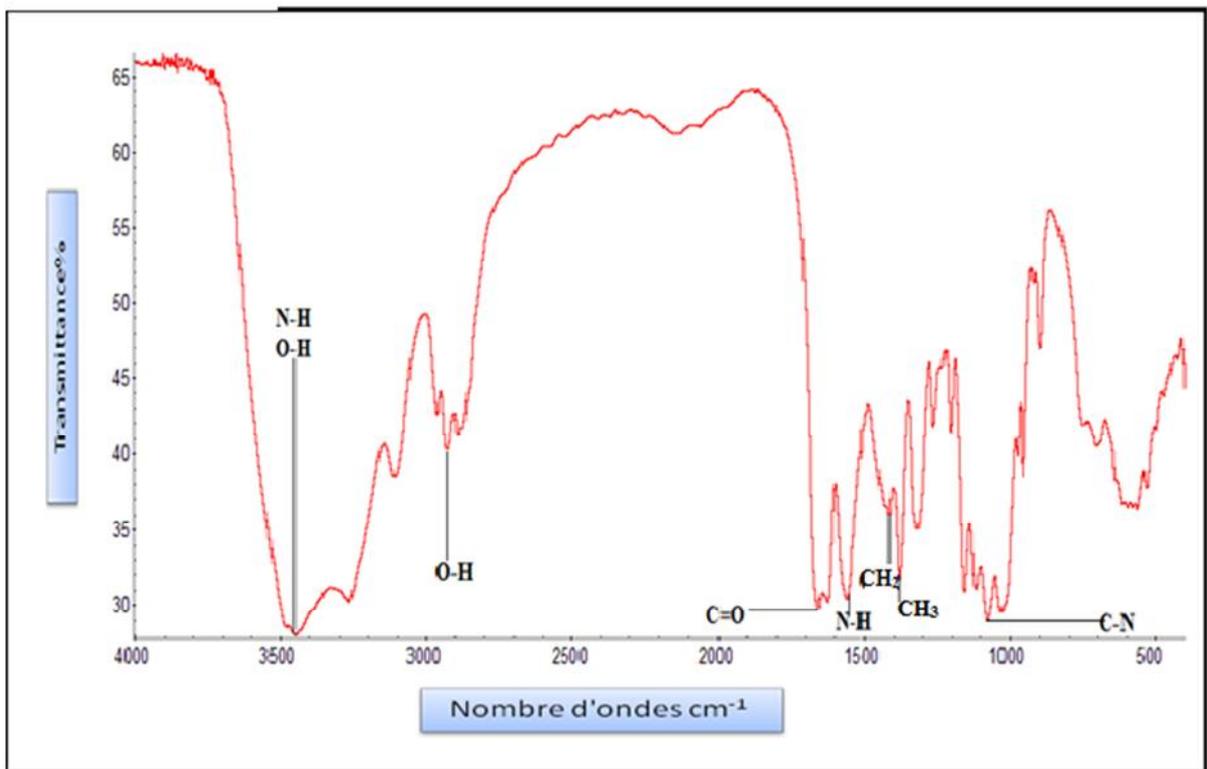


Figure 33 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°11

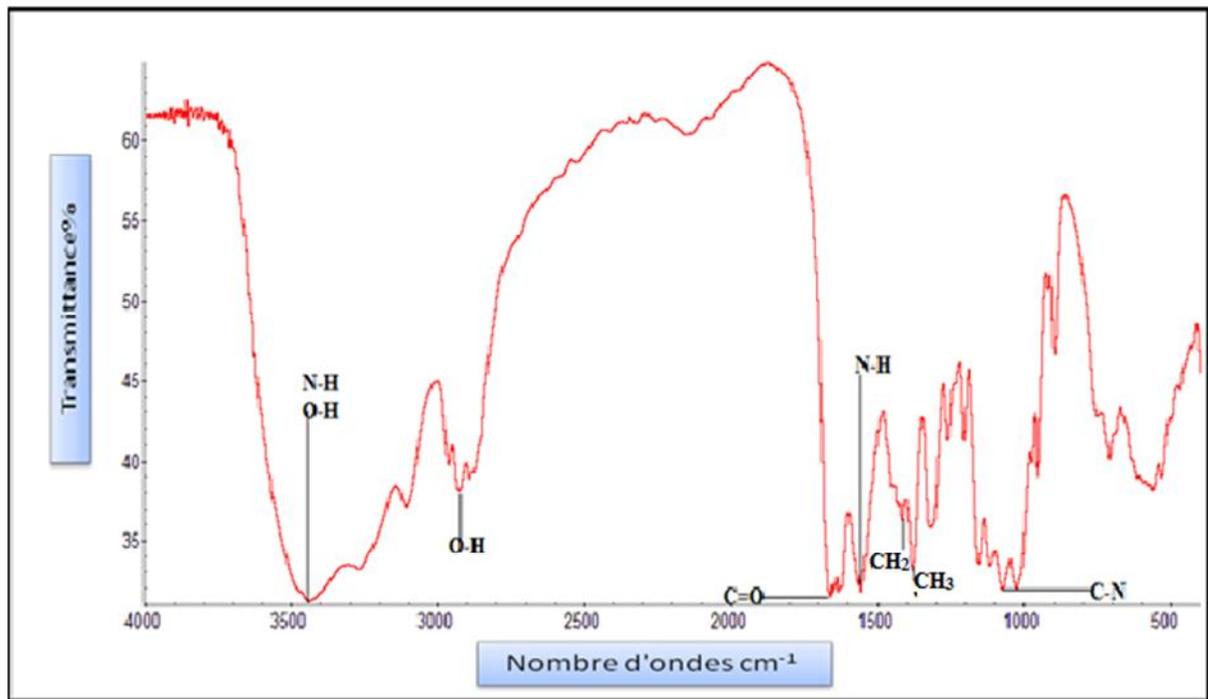


Figure 34 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°12

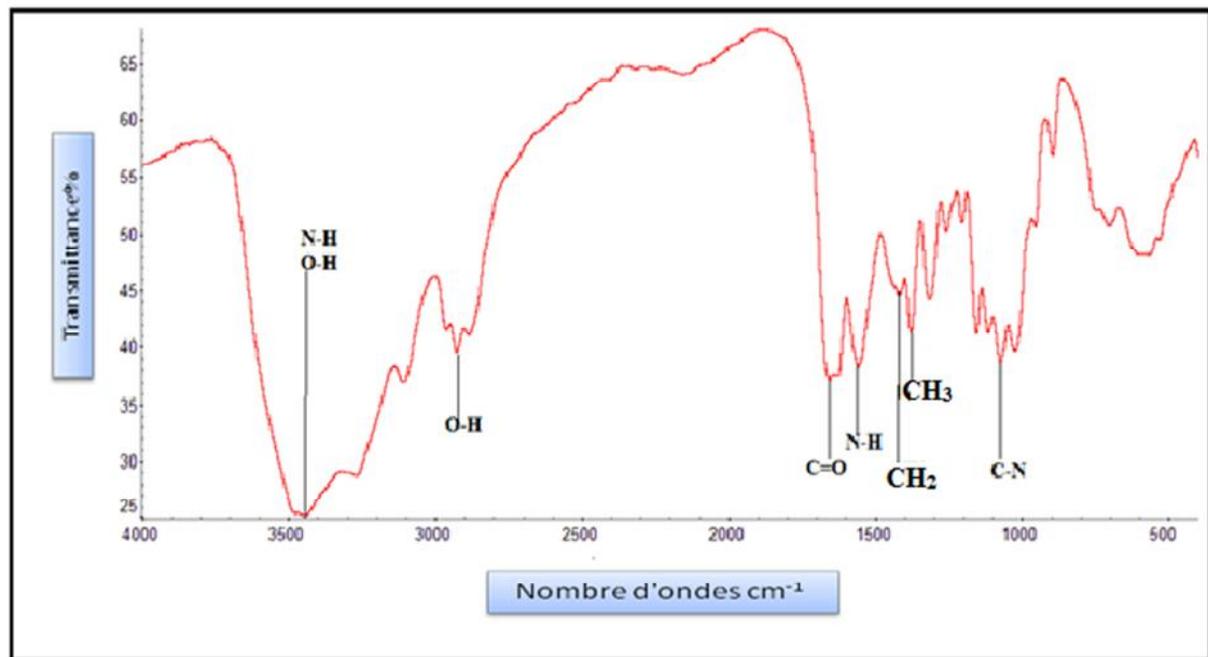


Figure 35 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°13

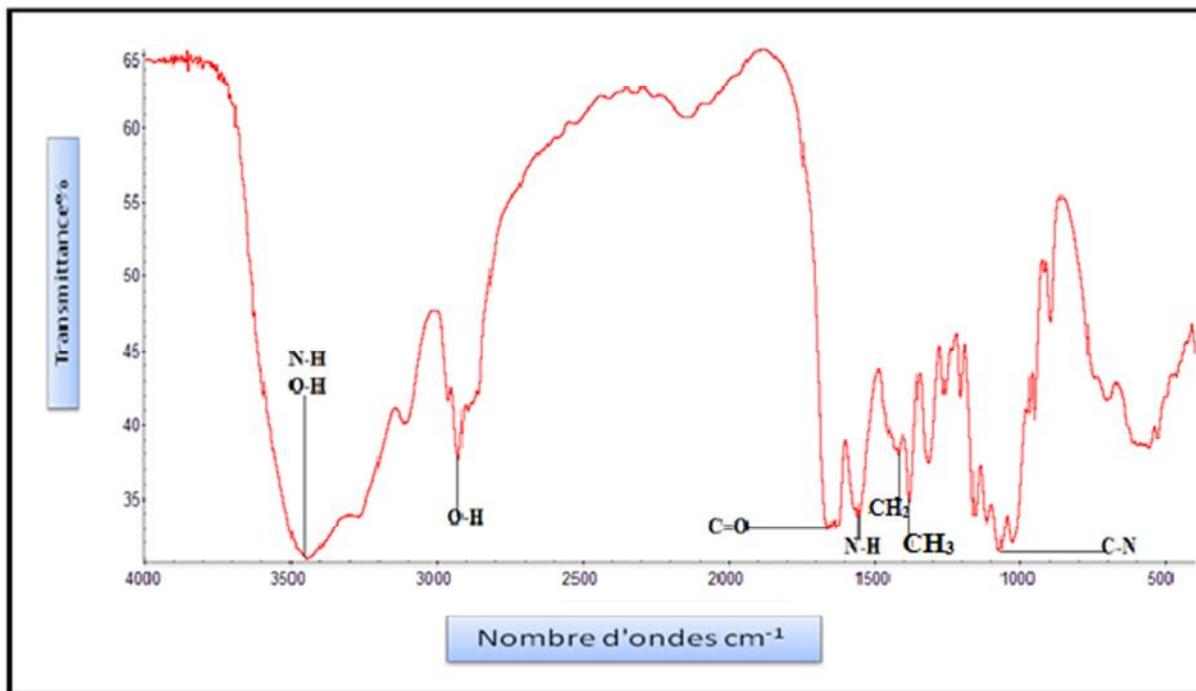


Figure 36: Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°14

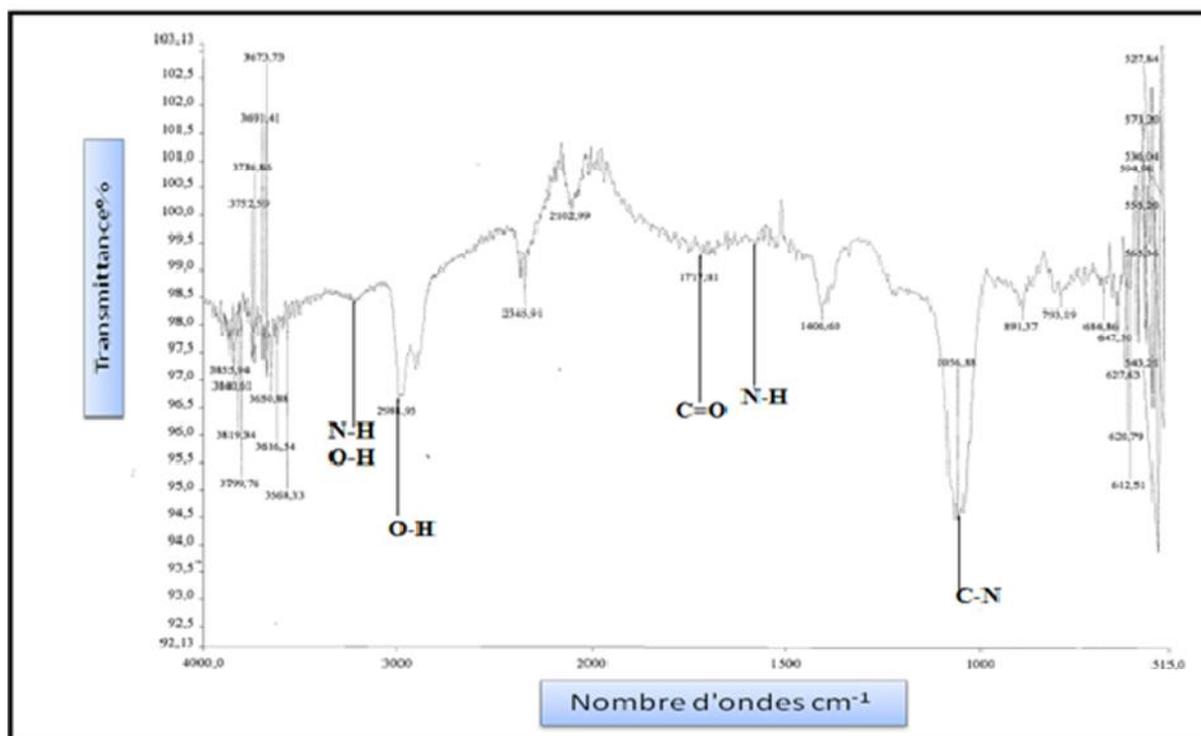


Figure 37 : Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°15

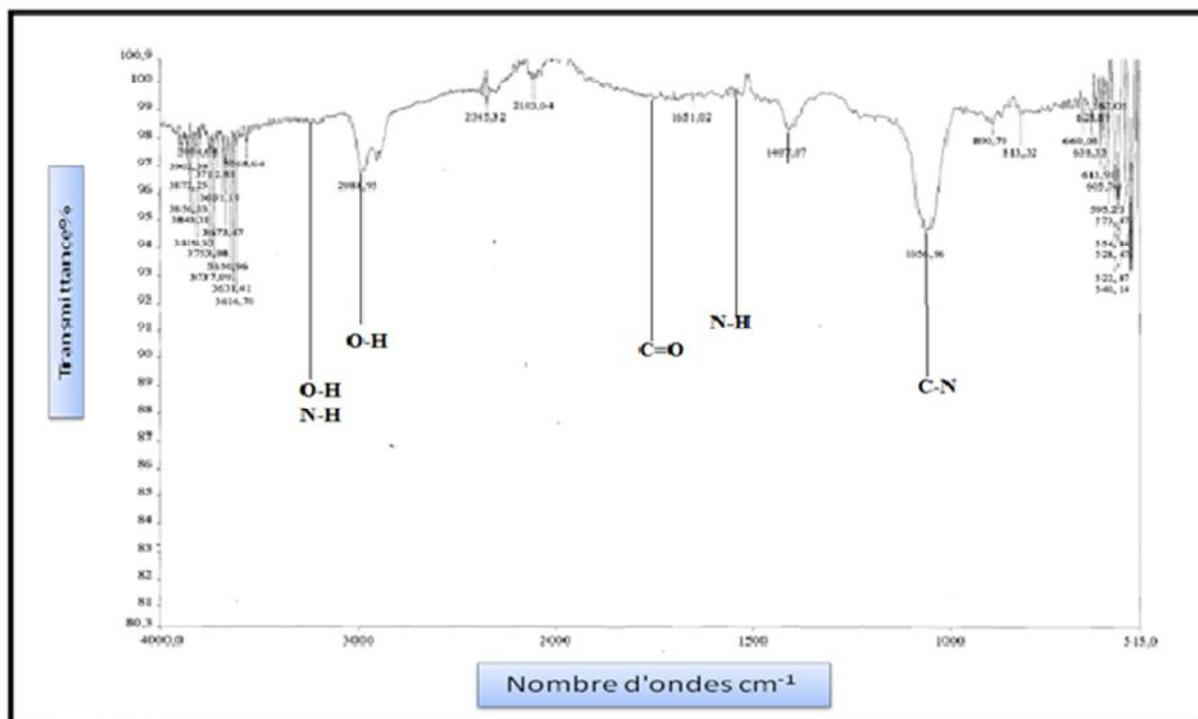


Figure 38: Spectre infrarouge du produit de l'expérience N°16

Annexe 2 : Spectres de diffraction des rayons X

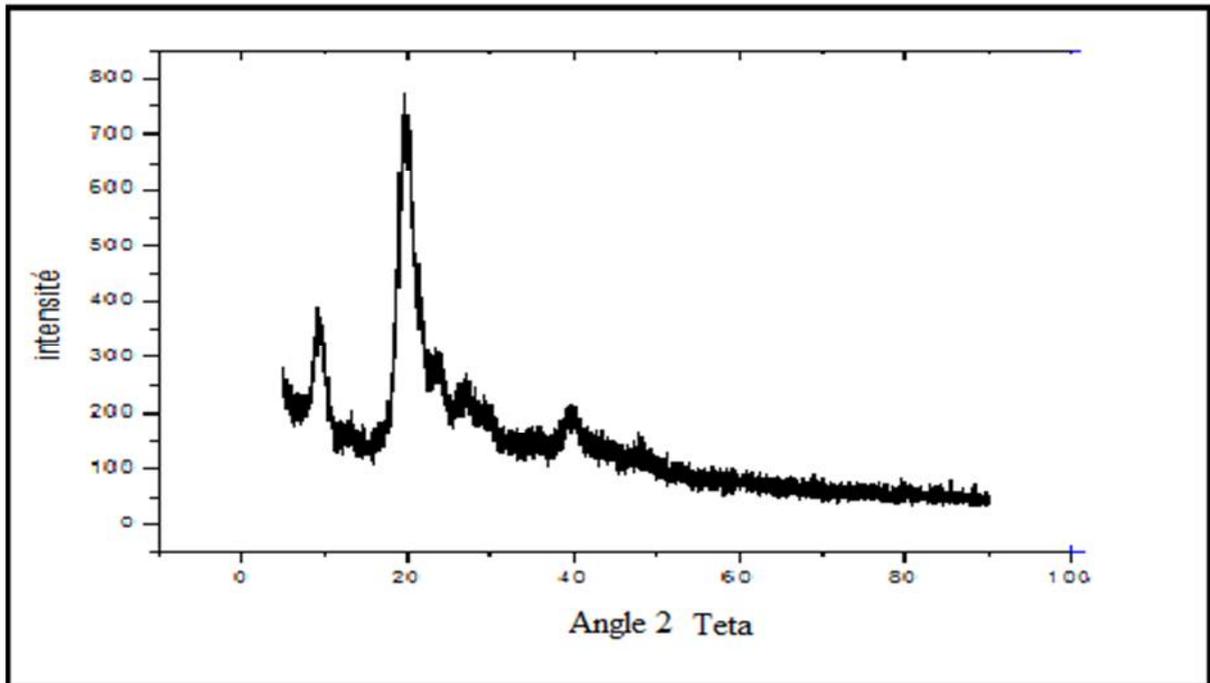


Figure 39 : Spectre de diffraction du produit de l'expérience N°2

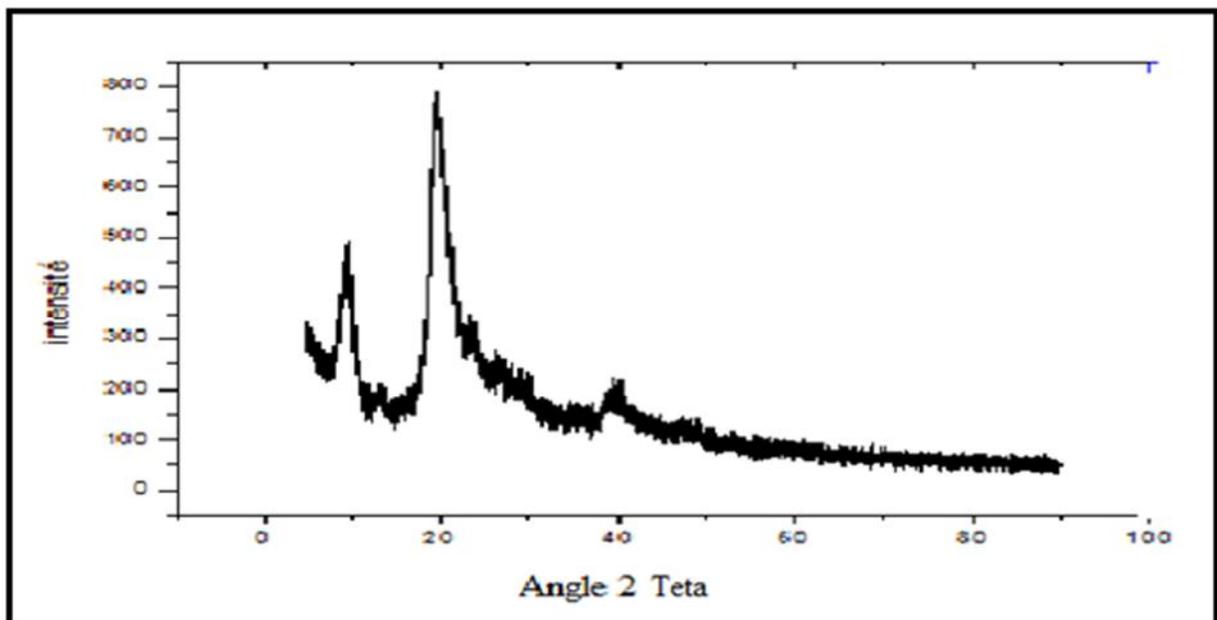


Figure 40 : Spectre de diffraction du produit de l'expérience N°3

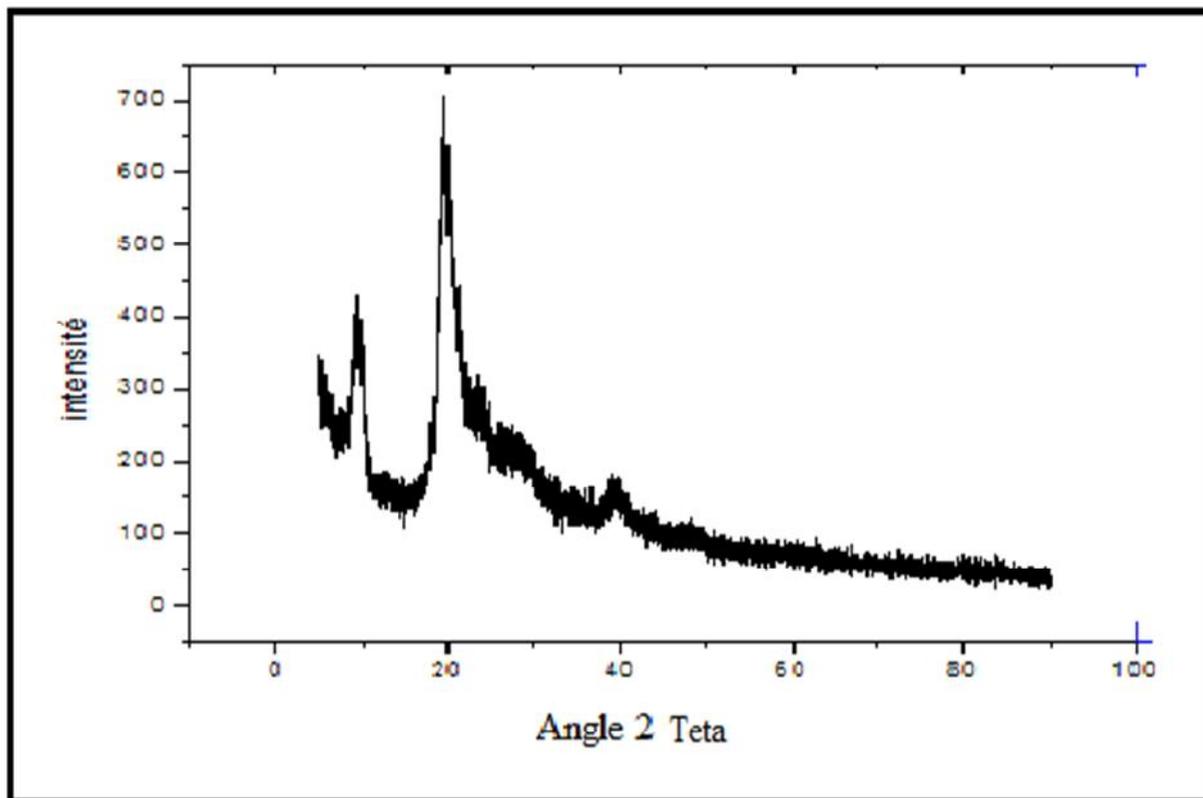


Figure 41 : Spectre de diffraction du produit de l'expérience N°4

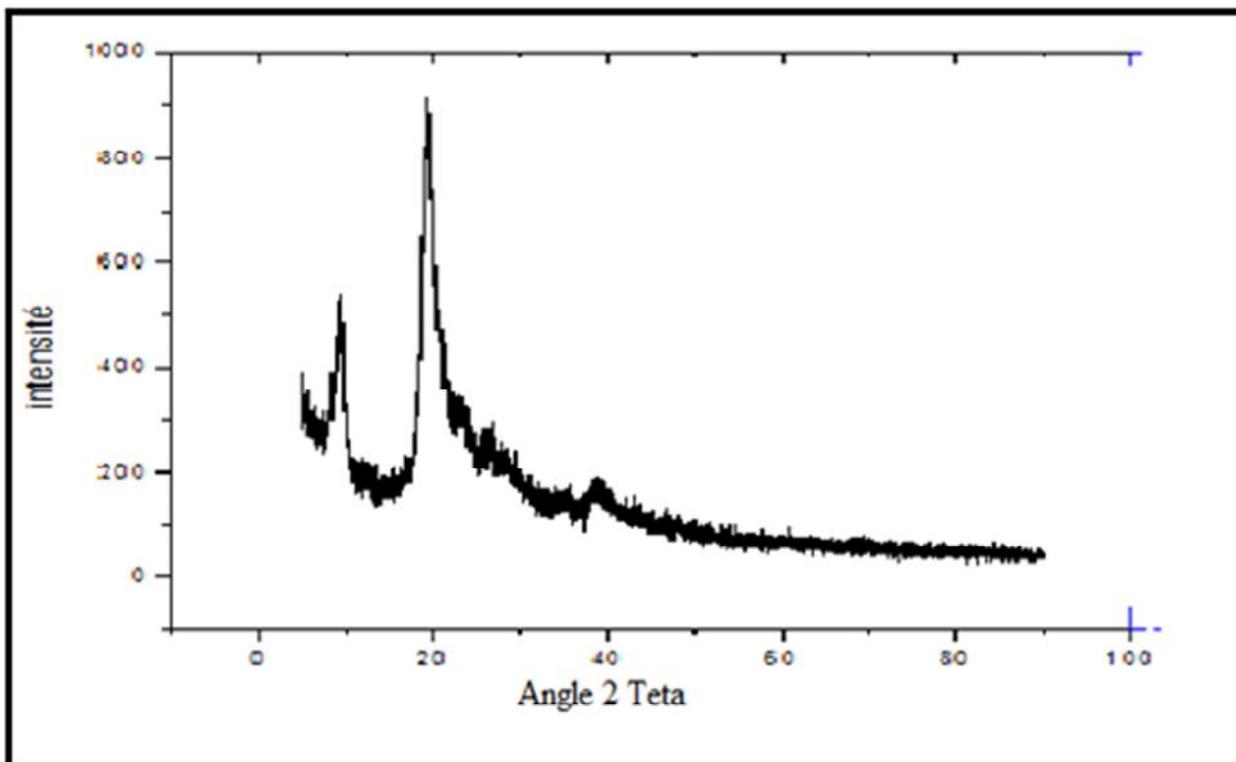
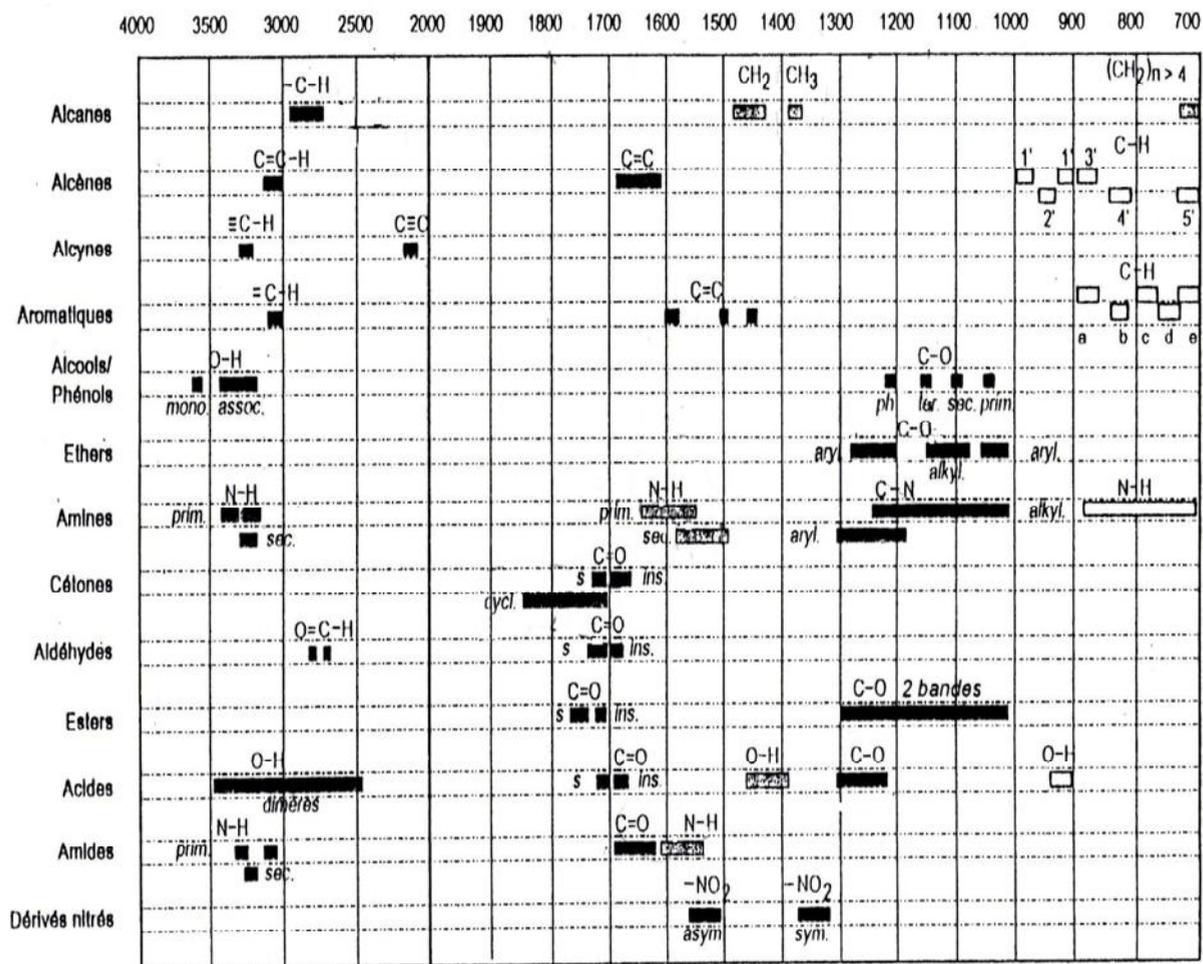


Figure 42 : Spectre de diffraction du produit de l'expérience N°5

Annexe 3 : Déplacements chimiques

Tableau XI : Corrélation dans le moyen infrarouge entre structure et vibration ν en fonction de nombre d'onde (cm^{-1}).



vibration d'élongation (ν)
 vibration de déformation (δ)
 vibration de déformation o.o.p (γ)

Abréviations :

s, saturé	a 1H isolé	1' -CH=CH ₂
ins, insaturé	b 2H adjacents	2' -CH=CH- (trans)
prim, primaire	c 3H adjacents	3' -C=CH ₂
sec, secondaire	d 4H adjacents	4' -C=CH-
ter, tertiaire	e 5H adjacents	5' -CH=CH- (cis)

Annexe 4 : Table statistique

Tableau XII : Table de la loi de student : test (t).

ddl \ α	0,01	0,02	0,05	0,1
1	63,657	31,821	12,706	6,314
2	9,925	6,965	4,303	2,920
3	5,841	4,541	3,182	2,353
4	4,604	3,747	2,776	2,132
5	4,032	3,365	2,571	2,015
6	3,707	3,143	2,447	1,943
7	3,499	2,998	2,365	1,895
8	3,355	2,896	2,306	1,860
9	3,250	2,821	2,262	1,833
10	3,169	2,764	2,228	1,812
11	3,106	2,718	2,201	1,796
12	3,055	2,681	2,179	1,782
13	3,012	2,650	2,160	1,771
14	2,977	2,624	2,145	1,761
15	2,947	2,602	2,131	1,753
16	2,921	2,583	2,120	1,746
17	2,898	2,567	2,110	1,740
18	2,878	2,552	2,101	1,734
19	2,861	2,539	2,093	1,729
20	2,845	2,528	2,086	1,725
21	2,831	2,518	2,080	1,721
22	2,819	2,508	2,074	1,717
23	2,807	2,500	2,069	1,714
24	2,797	2,492	2,064	1,711
25	2,787	2,485	2,060	1,708
26	2,779	2,479	2,056	1,706
27	2,771	2,473	2,052	1,703
28	2,763	2,467	2,048	1,701
29	2,756	2,462	2,045	1,699
30	2,750	2,457	2,042	1,697
Infini	2,576	2,326	1,960	1,684

α : seuil de signification.

ddl: degré de liberté.