

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



MEMOIRE

Présenté pour obtenir le Grade de

MASTER

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie de l'Environnement

Par

BENZERROUK Khadidja

Thème

PRODUCTION DES CHITOSANES ET LEUR CARACTERISATION

Soutenu le 3 Juillet 2013, devant le jury composé de :

KADRI Abdelaziz	Professeur - UMMTO	Président
ADOUR Lydia	Professeur - UMMTO	Rapporteur
KADOUCHE Slimane	MCA - UMMTO	Examinateur
DELLAH Mohamed	MAA - UMMTO	Examinateur
JOLY Michel	Directeur exploitation Station de traitement Taksebt, Algérie	Invité

2012-2013

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je souhaitais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

Je tiens à remercier sincèrement Professeur Adour Lydia, qui, en tant que Promotrice de mémoire, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble des techniciens des laboratoires de masters chimie de l'environnement et de chimie pharmaceutique du département de chimie, pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Merci d'avance aux membres de jury qui voudront bien me lire et m'écouter et surtout m'aider à progresser.

J'adresse un merci tout particulier à Monsieur JOLY Michel, Directeur de l'exploitation de la station de Taksebt qui nous a honorés par sa présence.

Je n'oublie pas mes parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis, qui m'ont toujours soutenus et encouragés au cours de la réalisation de ce mémoire.

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

Figure II.1 : Structure chimique de la chitine ----- 10

Figure II .2 : Structure chimique du chitosane. ----- 11

Figure II.3: Procédé de la fabrication de chitine et chitosane ----- 14

Photo III: Photo d'un viscosimètre à bille ----- 23

Figure III .1 : tube à vissie ----- 23

Photo IV : La solubilité d'une chitine avant et après désacétylation----- 25

Figure IV.1 : les spectres FTIR des ChitiBio DAT23, Chitine purifiée par voie biologique et ChitosCom (Fluka). ----- 28

Figure IV.2 : les spectres FTIR des ChitiBio DAT30, Chitine purifiée par voie biologique et ChitosCom (Fluka). ----- 29

Figure IV.3 : les spectres FTIR des ChitiChim DAT23, Chitine purifiée par voie chimique et ChitosCom (Fluka). ----- 30

Figure IV.4 : les spectres FTIR des ChitiChim DAT30, Chitine purifiée par voie chimique et ChitosCom (Fluka). ----- 31

Figure IV.5 : les spectres FTIR des ChitiCom DAT30, ChitineCom purifiée par voie chimique et ChitosCom (Fluka). ----- 32

Figure IV.6 : Evolution du degré DDA en fonction du temps pour les différentes chitines désacétylées à 23°C et 30°C ----- 33

Figure IV.7 : Le poids moléculaire des différentes chitines DA à différents temps de désacétylation et à différentes températures----- 35

Figure IV.8 : Micrographies MEB de la carapace brute de crevettes (Parapenaeus longirostris ----- 37

Figure IV.9: Micrographies MEB de la chitine purifiée par voie biologique----- 37

Figure IV.10 : Micrographies MEB de la chitine commerciale (Fluka)----- 38

Table des figures et des tableaux

<i>Figure IV.11 : Micrographies MEB de la ChitiBio DA11T23</i>	38
<i>Figure IV.12 : Micrographies MEB de la ChitiBio DA15T23</i>	39
<i>Figure IV.13: Micrographies MEB de la ChitiBio DA21T23</i>	39
<i>Figure IV.14 : Micrographies MEB de la ChitiBio DA10T30</i>	40
<i>Figure IV.15 : Micrographies MEB de la ChitiBio DA15T30</i>	40
<i>Figure IV.16: Micrographies MEB du chitosane commercial (Fluka)</i>	41
<i>Figure IV.17 : Micrographies MEB de la ChitiChim DA11T23</i>	41
<i>Figure IV.18: Micrographies MEB de la ChitiChim DA15T23</i>	42
<i>Figure IV.19 : Micrographies MEB de la ChitiChim DA21T23</i>	42
<i>Figure IV.20 : Micrographies MEB de la ChitiChim DA15T30</i>	43
<i>Figure IV.21 : Micrographies MEB de la ChitiChim DA23T30</i>	43
<i>Figure IV.22 : Micrographies MEB de la ChitiCom DA10T30</i>	44
<i>Figure IV.23 : Micrographies MEB de la ChitiCom DA15T30</i>	44
<i>Figure IV.24 : Micrographies MEB de la ChitiCom DA23T30</i>	45
<i>Figure IV.25 : Micrographies MEB de la ChitiCom DA15T30</i>	45
<i>Figure IV.26 : Micrographies MEB de la ChitiCom DA23T30</i>	46

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Répartition de la chitine et du carbonate de calcium chez les crustacés ----- 04

*Tableau I.2 : Les co-produits de crevette, ainsi que leur intérêt et leur domaine
d'utilisation----- 06*

Tableau I.3: Les différences de prix en fonction des catégories de dérivés de chitine----- 07

Tableau. I.4 : Répartition en 2006 des applications du chitosane (en tonnes)----- 08

*Tableau III.1: conditions opératoires de préparation des différentes chitines
désacétylées ----- 19*

Tableau IV.1 : Test de solubilité des différentes chitines désacétylées ----- 26

*Tableau IV.2 : Les viscosités intrinsèques et les poids moléculaire de chaque chitine
désacétylée à 23 et à 30 °C-----34*

ChitiBio DA: Chitine purifiée par voie biologique et désacétylée.

ChitiChim DA: Chitine purifiée par voie chimique et désacétylée.

ChitiCom DA: Chitine commerciale (Fluka) désacétylée

Chitos (Fluka): Chitosane commercial (Fluka).

DDA : Degré de désacétylation.

FTIR : Spectroscopie Infra-Rouge à transformée de Fourier.

MEB : Microscopie électronique à balayage

hab : Habitant.

KDa : Kilo Dalton.

USD : United States Dollar.

pH: Potentiel d'hydrogène.

PM : Poids moléculaire.

AA : Acide acétique.

C: Concentration en polymère

mPa·s : Milli Pascal·secondes

η_{inh} : Viscosité inhérente

η_{red} : Viscosité réduite

η_{sp} : Viscosité spécifique

[η] : Viscosité intrinsèque

η : Viscosité dynamique

t : Temps

T: Température

Table des matières

Introduction générale.....	01
----------------------------	----

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Les co-produits des crustacés et leur valorisation

I.1.Introduction	03
I.2.Les crustacés et l'organisation de leur cuticule.....	03
I.2.1.Définition.....	03
I.3.Les co-produits de crevette	04
I.3.1. Définition.....	05
I.3.2. Différentes voies de valorisation des co-produits (Crevettes).....	05
I.4.Valorisation des coproduits de crustacés dans le mandes : la production de chitine	05
I.5.Evolution des volumes de ventes par domaine d'application	06

Chapitre II: Chitine et Chitosane. Préparation, propriétés

II.1.Historique.....	08
II.2.Composition de la chitine	09
II.3.Propriétés de la chitine.....	09
II.4.Dérivés de la chitine	10
II.4.1.Le chitosane	11
II.4.1.1.Solubilité du chitosane	11
II.4.2. Dérivés carboxyméthylés de la chitine et du chitosane	12
II.4.2.1.O-carboxyméthylation de la Chitine et du chitosane	12
II.4.2.2.N-carboxyméthylation de la chitine et du chitosane	12
II.5.Production de la chitine	12
II.6.Production de chitosane à partir de la chitine (Processus de désacétylation).....	14

II.7.Principales propriétés du chitosane.....	15
II.7.1.Propriétés chimiques	15
II.7.2.Propriétés biologiques	16
II.8.Caractérisation physico-chimique du chitosane	16
II.8.1.Le degré de désacétylation (DD) ou le degré d'acétylation (DA)	16
II.8.2.La viscosité	16
II.8.3.La solubilité	17

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre III : Matériel et Méthodes

III.1 Matériel et méthodes expérimentales	18
III.1.1 Matériels	18
III.1.1.1 Produits utilisés	18
III.1.1.2. Petits matériels	19
III.1.1.3. Appareillages	19
III.2. Méthodes	20
III.2.1. Caractérisation des chitines désacétylées à température 23°C et 30°C	20
III.2.1.1. Test de solubilité	20
III.2.1.2. Détermination du DDA des chitines désacétylées par spectroscopie infrarouge (FTIR)	20
III.2.1.3. Détermination du poids moléculaire des chitines désacétylées par viscosimétrie	21
III.2.1.4 Microscopie électronique à balayage (MEB)	24

Chapitre IV : Résultats et Discussion sur la caractérisation des chitines désacétylées à température 23°C et 30°C

IV.1. Test de solubilité	25
IV.2. Détermination du DDA des chitines désacétylées par spectroscopie infrarouge (FTIR).....	27
IV.3. Détermination du poids moléculaire des chitines désacétylées par viscosimétrie	33
IV.4. Observation par microscopie électronique à balayage (MEB) des chitines désacétylées à 23°C et à 30°C	26

IV.4.1. La morphologie de la carapace brute de crevettes (<i>Parapenaeus longirostris</i>).....	36
IV.4.2. La morphologie de la chitine purifiée par voie biologique	37
IV.4.3. La morphologie des différentes chitines désacétylées à 23°C et à 30°C.....	38
IV.4.3.1. La morphologie des ChitiBio DA.....	38
IV.4.3.1.1. Micrographies des ChitiBio DA11,15,21T23	38
IV.4.3.1.2. Micrographies des ChitiBio DA10,15,20T30	39
IV.4.3.2. La morphologie des ChitiChim DA.....	42
IV.4.3.2.1. Micrographies MEB des ChitiChim DA11, 15,21T23 ..	42
IV.4.3.2.2. Micrographies des ChitiChim DA10, 15,21T30.....	43
IV.4.3.3. Les morphologies des ChitiCom DA.....	44
IV.4.3.3.1. Micrographie des ChitiCom DA10,15,23T30	44
Conclusion générale et perspectives	48
Références Bibliographiques	
Annexes	

INTRODUCTION
GENERALE

Face à un environnement instable et aux progrès technologiques, une prise de conscience nécessaire donne lieu à des développements de produits qui réduisent la pollution et respectent l'environnement. Ce sont pour la plupart des marchés de niches.

L'eau est indispensable à la vie sur terre, mais elle est également essentielle au développement industriel et agricole des sociétés humaines. Ce développement accéléré s'accompagne souvent d'une pollution de l'atmosphère et des eaux qui pose un réel problème pour l'environnement. La pollution de l'eau survient lorsque des matières sont déversées dans l'eau qui en dégrade la qualité, ce qui rend son utilisation dangereuse et perturbe le milieu aquatique en particulier la vie des poissons.

Les charbons actifs, principaux adsorbants utilisés en traitement des eaux, présentent de nombreux avantages, ils permettent l'élimination d'une large gamme de polluants dans différents types de colorants, mais aussi d'autres polluants organiques et inorganiques tels que les phénols, les ions métalliques, les pesticides, les détergents ...etc. Malgré leur excellent pouvoir adsorbant, leur utilisation est habituellement limitée à cause de leur coût élevé. Ainsi, au cours des récentes décennies, la découverte des matériaux adsorbants bon marché, ayant une efficacité comparable à celle des charbons actifs comme le gel de silice, les zéolithes, les algues et les matériaux argileux (bentonite, kaolinite...) constitue un important thème de recherche. Ces adsorbants naturels ont été étudiés avec succès pour l'élimination des polluants des cours d'eau, tels que les métaux lourds et les colorants.

Récemment, les recherches ont été orientées vers l'utilisation des produits chitineux tels que la chitine, le chitosane et ses dérivés. Ce sont des biopolymères les plus attractifs économiquement dans le traitement des eaux, grâce à leurs propriétés intrinsèques, leur abondance et leur faible coût. En plus, ils sont biodégradables et biorésorbables, deux propriétés primordiales à notre époque où la protection de l'environnement joue un rôle important.

Cette étude très originale a pour objectif principal la valorisation des co-produits marins et en particulier les déchets des crevettes (carapaces), par la préparation des chitosanes à partir de deux chitines purifiées par deux voies, l'une chimique et l'autre biologique. Pour chacune d'elles, une désacétylation basique a été réalisée à deux températures différentes et basses 23°C et 30°C avec une faible teneur en NaOH (40%) sans agitation et pendant une durée (t) variable de 10 à 23 jours. Ces conditions sont totalement différentes de celles mentionnées dans la bibliographie à savoir une température élevée (100 à 110°C), une concentration en NaOH de 40 à 60% et une durée de quelques heures sous agitation. Les nouvelles conditions

d'obtention du chitosane sont considérées comme « douces » car elles respectent et protègent l'environnement contre l'utilisation en excès des produits chimiques toxiques et polluants. L'autre avantage de ce produit naturel biologique est la réduction du coût de traitement, par exemple, dans le cas de l'application du chitosane comme agent de coagulation-floculation.

Vu que ce polysaccharide manifeste diverses applications dans les domaines variés : traitement des eaux, médecine, pharmaceutique et autres, nous avons envisagé de caractériser chacun des chitosanes préparés par la détermination de deux paramètres les plus importants : le degré de désacétylation (DDA) par spectroscopie FTIR et le poids moléculaire viscosimétrique (PM_v). Une comparaison des résultats a été effectuée avec le chitosane commercial (Fluka) afin de mettre en évidence l'efficacité des différents chitosanes préparés au laboratoire.

Ce mémoire est structuré en quatre chapitres:

Le **premier chapitre** a été consacré à l'étude bibliographique sur les crustacés et l'organisation de leur cuticule, leur valorisation dans le monde. Dans le **deuxième chapitre**, il a été présenté les structures, les préparations et les propriétés de la chitine et du chitosane.

Le **troisième chapitre** a comporté les matériels et les méthodes de caractérisation telles que la spectroscopie Infra-Rouge à transformée de Fourier (FTIR) pour le calcul du degré de désacétylation (DDA), la viscosimétrie (à bille et capillaire) pour le calcul de la viscosité du chitosane puis de son poids moléculaire dite viscosimétrique et enfin la microscopie électronique à balayage (MEB) pour l'observation de la structure de chacun des chitosanes obtenus à différents temps de désacétylation.

Le **quatrième chapitre** a été consacré à la présentation et à l'interprétation des résultats expérimentaux.

Enfin, le mémoire a été finalisé par une conclusion générale où seront rassemblés les résultats pertinents de cette contribution avec une proposition de quelques perspectives.

CHAPITRE I : LES CO-
PRODUITS DES CRUSTACES
ET LEUR VALORISATION

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1.Introduction

L'activité humaine, particulièrement industrielle, produit des quantités phénoménales de déchets. Certains de ces déchets ont une grande valeur que la biotechnologie permet de matérialiser.

Le marché des produits aquatiques ne cesse d'augmenter à l'échelle internationale. La forte hausse de la demande est principalement liée à l'augmentation de la consommation humaine. Elle représentait 0,7 Kg par habitant en 1970 tandis qu'elle a atteint 7,8 Kg par habitant en 2008, soit une augmentation de 6,6% par an (FAO, 2010).

Avant la crise de 2009, l'augmentation de la consommation était particulièrement marquée pour les crustacés, principalement la crevette. La consommation mondiale est passée de 0,4 Kg/hab en 1961 à 1,6 Kg/hab en 2005. Aujourd'hui, la crevette est la première valeur échangée parmi les produits marins. Sa production annuelle mondiale était estimée à plus de 6 millions de tonnes en 2005. La région Asie-Pacifique, et notamment la Chine, la Thaïlande, le Vietnam, l'Indonésie et l'Inde, est la principale productrice, totalisant près de 88% des productions. Les exportations de crevettes atteignent 14 milliards de dollars par an, soit 16% des produits marins.

L'augmentation de la production des crustacés entraîne une augmentation du volume de leurs co-produits. L'élimination de ces déchets a toujours été dispendieuse et a souvent eu un impact nuisible sur l'environnement. En effet, pendant longtemps, les conserveries de crustacés produisaient de grande quantité de déchets qui n'étaient pas recyclés et étaient simplement rejetés à la mer, créant de sérieux problèmes de pollution au voisinage des sites de production. Mais grâce aux progrès techniques et au développement des marchés, il est maintenant possible, de transformer ce flux de déchets en produits utiles et commercialisable. Des plateformes de décorticage de crevettes existent notamment au Maroc et en Asie. Leur principale voie de valorisation est la production de chitine, l'un des composés majoritaires des cuticules de crustacés.

I.2.Les crustacés et l'organisation de leur cuticule

I.2.1.Définition

Les crustacés habitent, pour la plupart, la mer : crabes, crevettes, langoustes, homards, langoustines, mais on trouve aussi en eau douce certaines espèces de crevettes et de crabes, ainsi que les écrevisses dont le corps est protégé par une carapace rigide.

Les crustacés sont riches en protéines et en sels minéraux, notamment en ce qui concerne le zinc et le cuivre. Ils contiennent également des vitamines du groupe B. Ils sont pauvres en graisses, mais ils contiennent du cholestérol. Heureusement, il est essentiellement concentré dans la tête que l'on ne mange généralement pas.

I.2.2.L'organisation de la cuticule des crustacés

Les cuticules de crustacés sont constituées de chitine, protéines et minéraux (essentiellement le carbonate de calcium). Les proportions sont variables selon les espèces. Le tableau I.1 illustre les quantités de chitine et de carbonate (Kurita, 2006) que l'on peut trouver selon la source. Les ressources traditionnellement exploitées pour extraire la chitine, sont composées de 15 à 40% de chitine, 20 à 40% de protéines et 20 à 50% de carbonate de calcium (en poids sec). Pour une espèce donnée, la répartition est plus stable

Tableau I.1 : Répartition de la chitine et du carbonate de calcium chez les crustacés
(Kurita, 2006)

Source	Chitine (%)	CaCO₃ (%)
Cuticule de crabe	15-30	40-50
Cuticule de crevette	30-40	20-30
Cuticule de bouquet	20-30	20-25
Plume de calmar	20-40	Négligeable
Coquille d'huître/ palourde	3-6	85-90
Cuticule d'insectes	5-25	Négligeable
Paroi de cellule fongique	10-25	Négligeable

Les trois constituants majoritaires, chitine, protéines et CaCO₃, forment un réseau dense. La chitine y joue plusieurs rôles structurels et fonctionnels vitaux. Elle forme une barrière physique entre le corps de l'organisme et son environnement (Roer et Dillaman, 1984). 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. Enfin, elle joue un rôle dans le système immunitaire (Tokura et Tamura, 2007).

I.3. Les co-produits de crevette

I.3.1. Définition

Les co-produits sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production. Ils sont issus de la transformation des crevettes pour la consommation humaine et sont constitués de la tête, la carapace et la queue. Les co-produits marins constituent 30 à 60% des produits entiers et leur valorisation a attiré depuis plusieurs années l'attention des industriels pour un souci de rentabilité économique et de développement durable. En effet, ces matières renferment de nombreuses molécules valorisables notamment des protéines (Ibrahim et al., 1999 ; Heu et al., 2003), lipides (Dumay *et al.*, 2006) minéraux, vitamines (Heu et al., 2003), ainsi que d'autres composés bioactifs (Kim *et al.*, 2008), bénéfiques à la santé humaine et animale.

I.3.2. Différentes voies de valorisation des co-produits (crevettes)

De part le contenu en composés aux caractéristiques précises, les co-produits de crevette peuvent servir à la production de produits de haute valeur marchande. Ces produits dérivés trouvent leur application essentiellement en diététique, nutraceutique, pharmaceutique et en cosmétique (Johnson, 2002). Les principaux produits à haute valeur ajoutée pouvant être engendrés par les co-produits de crevette, ainsi que leur intérêt et leur domaine d'utilisation sont résumés dans le tableau I.2.

Tableau I.2 : Les co-produits de crevette, ainsi que leur intérêt et leur domaine d'utilisation

Produits	Intérêt	Domaine d'utilisation
Chitine et Chitosan	Bioactivité Rétention d'eau Chélation de métaux	Agroalimentaire Nutraceutique Pharmaceutique Cosmétique Agriculture Traitement des eaux
Astaxanthine	Bioactivité Pigmentation	Alimentation animale Alimentation humaine Nutraceutique
Peptides	Bioactivité Digestibilité élevée	Alimentation humaine Alimentation animale Nutraceutique Milieu de culture microbienne
Substances aromatiques	Aromatisant naturel	Agroalimentaire
Glucosamine	Nutrition	Diététique
Phosphatase alcaline	Enzymatique	Biotechnologie
Éléments minéraux	Nutrition	Agroalimentaire

I.4. Valorisation des coproduits de crustacés dans le monde : la production de chitine

Les co-produits de crustacés représentent plus de 60% du poids frais (Wang et al. 2011). Ce volume constitue une ressource abondante de chitine. Ce polysaccharide ancien constitue l'exosquelette des crustacés. Les domaines d'application de la chitine et de ses dérivés ne cessent de s'étendre (Cf. section III).

La production de chitine se situe en majorité en Asie-Pacifique. Les co-produits de crustacés y sont disponibles et la législation liée au retraitement des effluents est peu contraignante. En 2004, on répertoriait 63 producteurs de chitine ayant une place importante sur le marché, dont la moitié en Asie (Montfort-Windels, 2004). Le Japon est le premier producteur (FAO, 2009).

Pour la plupart des applications, la chitine n'est pas utilisée directement. Elle est convertie, principalement en chitosane et chitooligosaccharides. La production de chitine était de l'ordre de 25000 tonnes en 2006, dont près de 8000 tonnes pour sa conversion en chitosane (GIA, 2010). En 2000, 10000 tonnes de chitine étaient produites (Kurita, 2006), dont près de 6667 tonnes pour la fabrication de glucosamine, 2667 tonnes pour le chitosane et 1000 tonnes pour les oligosaccharides. Le marché de la chitine n'a cessé de croître. Les ventes de chitine ont atteint près de 25000 tonnes en 2006 (GIA, 2010)

Le Japon domine nettement le marché de la chitine. Il participe à 61% des ventes mondiales. Les perspectives annoncées à l'horizon 2015 maintiennent globalement ces écarts entre les régions. La production de chitine atteindrait près de 63000 tonnes (GIA, 2010).

En 2006, 60% de la chitine a été convertie en glucosamine. Ceci place la glucosamine au premier rang des volumes de ventes. Le second dérivé est le chitosane, dont la part des ventes représente près de 34%. Cependant, ces chiffres masquent des disparités régionales. Par exemple, en Asie-Pacifique la même année, la part du chitosane est supérieure à celle de la glucosamine (50% contre 46%). Au contraire, le Japon consomme 25% de chitosane contre plus de 66% de glucosamine. Les perspectives tendent vers une très légère diminution de la part des « autres dérivés » au profit de la glucosamine et du chitosane (GIA, 2010).

L'Asie produit de la chitine à un coût très compétitif. En Chine, 90% de ce coût correspond au prix des matières premières et des réactifs (CCM International, 2009). Le tableau I.3 montre les différences de prix en fonction des catégories de dérivés de chitine (Einbu, 2007).

Tableau I.3: Les différences de prix en fonction des catégories de dérivés de chitine
(Einbu, 2007).

Dérivés	Production (tonnes)	Chitine consommée (tonnes)	Prix du marché (USD/Kg)
Glucosamine	4500	9000	7–35
Chitosane	3000	4000	10–100
Oligosaccharides	500	1000	50–100
N-acétylglucosamine	100	200	20–140

USD : United States Dollar

Le principal critère qui définit le prix est le taux de pureté, lui-même lié au procédé d'extraction de la chitine. (Einbu ,2007) rapporte des prix bien plus élevés pour des dérivés de très forts degrés de pureté, de l'ordre de 10000 USD/Kg pour des oligosaccharides ultra-purs et 50000 USD/Kg pour le chitosane. Les prix de la N-acétylglucosamine obtenue par voie chimique et par voie enzymatique sont de l'ordre de 20 USD/Kg et de 100 à 140 USD/Kg, respectivement.

I.5.Evolution des volumes de ventes par domaine d'application

Les applications du chitosane sont largement dominées par le secteur du traitement de l'eau, qui atteint plus de 4000 tonnes consommées en 2006. Ce secteur est suivi par celui de la cosmétique, de l'agroalimentaire, du médical et de l'agrochimie. Les autres secteurs tels que la biotechnologie, la papèterie, le textile et la photographie représentent de faibles volumes de ventes. Les prévisions évolueraient peu à l'horizon 2015 (GIA, 2010).

Le premier pays consommateur de chitosane, notamment pour le secteur du traitement de l'eau est le Japon, avec près de 3700 tonnes en 2006. Les pays occidentalisés, tels que les États-Unis, consomment davantage le chitosane dans les domaines de la cosmétique, de l'agroalimentaire, du médical et de la biotechnologie. La zone Asie-Pacifique est leader dans la consommation du chitosane en agriculture/agrochimie (Tableau. I.4).

Tableau. I.4 : Répartition en 2006 des applications du chitosane (en tonnes) (GIA, 2010)

Domaine d'application	USA	Europ e	Japon	Asie- Pacifique	Canada	Autres	Total
Traitement de l'eau	450,3	368,6	2900,8	245,8	74,9	101,0	4141,4
Cosmétique	535,8	173,6	209,6	136,4	54,2	79,8	1189,4
Agroalimentaire	352,0	209,6	197,2	72,2	67,8	33,1	931,9
Santé/Médecine	306,5	84,9	156,2	200,5	31,1	13,9	793,1
Agrochimie	125,6	73,4	89,0	285,5	29,2	20,0	622,7
Biotechnologie	131,2	37,1	57,5	45,2	15,8	12,1	298,9
Pulpe/papier	39,1	28,9	36,1	29,6	11,2	6,8	151,7
Textile	23,47	17,8	25,5	19,9	6,3	4,3	97,3
Photographie	13,04	9,1	29,7	8,9	2,9	1,7	65,3
Applications diverses	28,89	18,9	54,1	19,1	8,3	4,1	133,4
TOTAL	2005,9	1021,9	3755,7	1063,1	301,7	276,8	8425,1

CHAPITRE II: CHITINE ET
CHITOSANE.
PREPARATION,
PROPRIETES

II.1.Historique

En 1811, le professeur Henri Braconnot, directeur du jardin botanique à Nancy (France), a été le premier à isoler une substance fibreuse d'un certain type de champignon, qu'il a appelée fongine. De plus, il a observé que cette substance n'est pas soluble dans les solutions aqueuses d'acide. Cette découverte précède de trente ans l'isolement de la cellulose des plantes. Une décennie plus tard, en 1823, la même substance a été trouvée dans certains insectes (coléoptère) et a été ensuite nommée chitine par Odier (chitine provient du mot grec "kitos" qui signifie l'enveloppe).

Aujourd'hui, la chitine est obtenue principalement des sous-produits de pêche des crustacés qui en contiennent de 20-50% sur base sèche (No HK, Meyers SP, 1995)

En 1859, le professeur C. Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin et a observé les différentes solubilités de la chitine. La substance, résultat du traitement alcalin, a pu être dissoute dans les acides. Cependant, seulement en 1894 cette substance a été nommée chitosane par Hoppe-Seyler (Jaouen D, 1994).

Entre 1930 et 1940, ces biopolymères ont suscité beaucoup d'intérêt dans le monde oriental, principalement pour l'application dans le domaine médical et la purification de l'eau.

Aujourd'hui, nous savons que la chitine et le chitosane se trouvent abondamment dans la nature et sont des ressources renouvelables, non toxique et surtout biodégradable. La production annuelle de chitine dans la nature est estimée à 109-1010 tonnes et actuellement elle n'est pas très exploitée et commercialisée par rapport à la cellulose (Peter M.G, 2002).

II.2.Composition de la chitine

La chitine est le polysaccharide aminé le plus répandu dans la nature. On le trouve principalement dans les parois cellulaires des champignons et dans l'exosquelette des arthropodes et des insectes (Merzendorfer et Zimoch, 2003). La structure chimique de la chitine est semblable à celle de la cellulose (Figure II.1), à la différence près qu'il s'agit d'un homopolymère d'unités de N-acétyl- β -D-glucosamine (NAG) et non de glucose. L'unité structurelle de base est le chitobiose, constitué de 2 résidus de NAG reliés entre eux par des liaisons glycosidiques de type β -1,4. Selon Austin et al. (1981), la fonction acétylamine de la chitine lui conférerait une résistance accrue par rapport à la cellulose.

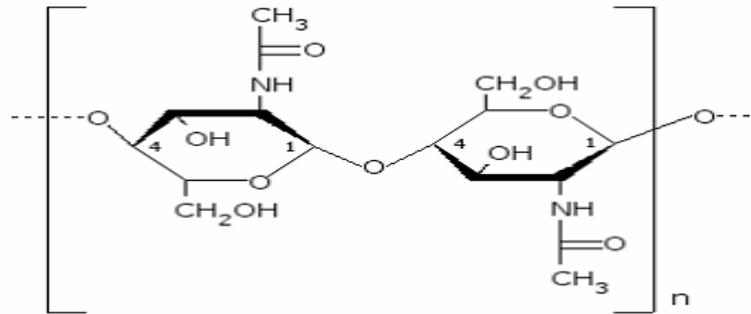


Figure II.1 : Structure chimique de la chitine

II.3. Propriétés de la chitine

La chitine possède de nombreuses qualités grâce à des propriétés uniques :

➤ Biocompatibilité

Chitine et chitosan, biopolymères naturels n'ont aucun caractère antigénique et de ce fait sont parfaitement compatibles avec les tissus vivants. Leur caractère antithrombogène et hémostatique confirme leur possibilité d'emploi dans tous les domaines de la biologie.

➤ Cicatrisant

Le chitosan forme des films perméables à l'air. Il favorise la régénération cellulaire tout en protégeant les tissus des agressions microbiennes. On a reconnu, de plus, au chitosan une activité biostimulante sur la reconstitution de tissus. Cette propriété a permis la fabrication d'une peau artificielle utilisée pour les greffes aux grands brûlés et des applications en chirurgie comme les fils de suture en chitine

➤ Anticholestémiant

Le chitosane est capable de piéger les lipides à leur pH d'insolubilisation dans le tube digestif. Administré à des rats, le chitosane diminue de façon significative le taux de cholestérol dans le sang.

➤ Agent de chélation

La chitine et ses dérivés sont des agents remarquables de chélation. Le chitosan est utilisé aussi bien comme support de chromatographie que le piégeage des métaux lourds et l'épuration des eaux usées.

➤ **Biodégradabilité**

La chitine et le chitosan sont biodégradables. Des enzymes, la chitinase et la chitosanase scindent ces biopolymères en oligopolymères pris en charge par le métabolisme.

II.4.Dérivés de la chitine :

II.4.1.Le chitosane

Le terme chitosane, loin de répondre à une seule et unique structure chimique bien définie (Figure II .2), s'adresse à toute une famille de copolymères composés de N-acétyl D-glucosamine et de D-glucosamine en proportions variables (Felt, 1999). Il est obtenu par désacétylation totale ou partielle de la chitine. Dans la nature, le chitosane est rare et n'est présent que dans les parois d'une classe particulière de champignons, les Zygomycètes (Rhizopus, Mucor, etc.) (Juang *et al.* 2002) et chez certains insectes comme dans la paroi abdominale des reines termites (Seng, 1988). Néanmoins la majorité des chitosanes commercialisés proviennent de la désacétylation alcaline de la chitine à chaud. On parlera de chitosane si le D.D est supérieur à 60% (David *et al.* 2004).

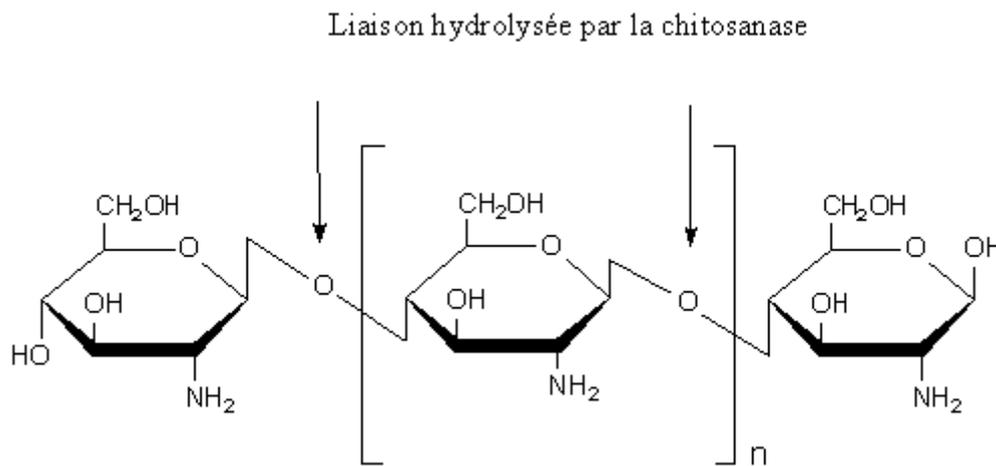


Figure II .2 : Structure chimique du chitosane.

II.4.1.1.Solubilité du chitosane :

Le chitosane est typiquement insoluble dans l'eau et les solutions alcalines. Il est cependant, soluble dans les solutions minérales ou organiques diluées, excepté dans l'acide sulfurique et à un moindre degré dans l'acide phosphorique (Chenite *et al.* 2001).

II.4.2. Dérivés carboxyméthylés de la chitine et du chitosane :

L'introduction de groupements carboxyméthyles dans la chitine ou dans le chitosane conduit à la formation de dérivés anioniques (Kurita, 2001).

II.4.2.1.O-carboxyméthylation de la Chitine et du chitosane :

Cette réaction touche préférentiellement le carbone 6 des résidus glucosamines acétylés ou pas. Elle est réalisée en milieu alcalin en présence de l'acide monochloroacétique.

II.4.2.2.N-carboxyméthylation de la chitine et du chitosane :

Cette réaction contrairement à la précédente est régiosélective, elle touche uniquement les groupements amines de la chitine ou du chitosane. Ces derniers réagissent avec l'acide glyoxylique (OCHCOOH) en milieu acide formant la base de Schiff qui est convertie en N-carboxyméthyle chitosane par réduction au cyanoborohydrure de sodium (NaCNBH₃) (Kurita, 2001).

II.5.Production de la chitine

De nombreuses méthodes ont été développées afin de préparer la chitine à partir des exosquelettes. De manière générale, elles consistent à éliminer les éléments minéraux (démminéralisation), les protéines (déprotéinisation) et la couleur (blanchiment) (Figure II.1)

➤ Déminéralisation

La déminéralisation est généralement réalisée par un traitement acide sous agitation pour solubiliser le carbonate de calcium et le chlorure de calcium. Les acides les plus fréquemment utilisés sont l'acide chlorhydrique et l'acide formique à des concentrations de 1 à 10mol.L⁻¹. La durée du traitement acide est de l'ordre de 1 à 48 heures à la température ambiante. La condition optimale est obtenue par le traitement des carapaces sèches en poudre avec HCl 1mol.L⁻¹ pendant 30 minutes à la température ambiante et le rapport du solide au solvant est 1:15 (w/v), c'est-à-dire 1g de carapaces en poudres pour 15ml de solvant (No *et al.* 1989). Pendant le processus de déminéralisation, des mousses indésirables peuvent se former dues à la production de dioxyde de carbone [CaCO₃ + 2HCl ⇒ CaCl₂ + CO₂(↑) + H₂O]. (No *et al.* 1998) ont recommandé d'utiliser une antimousse commerciale contenant 10% de solution de silicone active.

➤ Déprotéinisation

A l'état naturel, la chitine se présente en association avec les protéines (Chitinoprotéine). Les protéines sont éliminées par un traitement basique en utilisant, en général, des solutions à base de NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, Na₂SO₃, CaSO₃, ou Na₃PO₄, de concentrations de 0,1 à 5mol.L⁻¹. La solution d'hydroxyde de sodium (~10%

massique) est la plus souvent utilisée pour dissoudre les protéines. La durée du traitement basique est de l'ordre de 0,5 à 72 heures à hautes températures (65-100°C). No et Meyers (1995) ont rapporté que la proportion du solide à la solution alcaline allant de 1:10 à 1:20 (w/v) est recommandée pour que l'élimination des protéines soit efficace.

Pendant le processus de déprotéinisation, la formation de mousse peut se produire mais la mousse n'est pas intense comme celle du processus de déminéralisation (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003). Shahidi et Synowiecki (1991) ont suggéré que la déprotéinisation est optimale en utilisant une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium dont le pH doit être plus bas que le point isoélectrique des protéines pour qu'elles précipitent.

➤ **Blanchiment**

Pour les applications industrielles, la chitine obtenue à partir des ressources de crustacés doit être décolorée après les traitements acide et alcalin (No *et al.* 1989). Le pigment dans les carapaces de crustacés forme un complexe avec la chitine. (Fox, 1973) a détecté un dérivé de β -carotène solidement relié à la chitine de l'exosquelette des crabes rouges. Le blanchiment est souvent réalisé par un traitement avec des agents oxydants (KMnO_4 , NaOCl , SO_2 , NaHSO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ou H_2O_2). Ce traitement peut éliminer des traces de pigments résiduels, comme les caroténoïdes.

Durant le processus de blanchiment, le réactif utilisé ne doit pas avoir un effet sur les propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane. (No *et al.* 1989) ont pu fabriquer la chitine quasiment blanche par l'extraction avec l'acétone et le séchage pendant 2 heures à la température ambiante, suivi par le blanchiment en utilisant une solution 0,315% d'hypochlorite de sodium pendant 5 minutes avec un rapport du solide au solvant 1:10 (w/v). Sans l'extraction préalable par l'acétone, le blanchiment doit être effectué plus de 1 heure pour aboutir à un produit blanc acceptable commercialement.

Des études récentes ont montré que la déminéralisation pouvait être effectuée en 15 minutes à la température ambiante, avec un excès d'acide chlorhydrique $0,25\text{mol.L}^{-1}$ et la déprotéinisation réalisée avec une solution de NaOH 1mol.L^{-1} pendant 24 heures à 70°C (Percot.A *et al.* 2003).

La chitine est biodégradable et non toxique ($\text{DL50} = 17 \text{ g.Kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$), elle est hydrolysée progressivement par des glycosidases, comme des lysozymes et des chitinases. Du fait de sa forte cristallinité, la chitine n'est soluble que dans des solvants peu communs, ce qui limite son utilisation et sa valorisation. En effet, elle n'est soluble que dans le 2-hexafluoropropanol, et dans des mélanges tels que le diméthylacétamide/chlorure de

lithium, le diméthylformamide/chlorure de lithium ou l'acide trichloroacétique / dichloroéthane (Ravi Kumar , M.N.V . 2000). De nombreux dérivés de chitine ont été préparés dans le but d'améliorer la solubilité, le plus simple étant le chitosane obtenu par désacétylation.

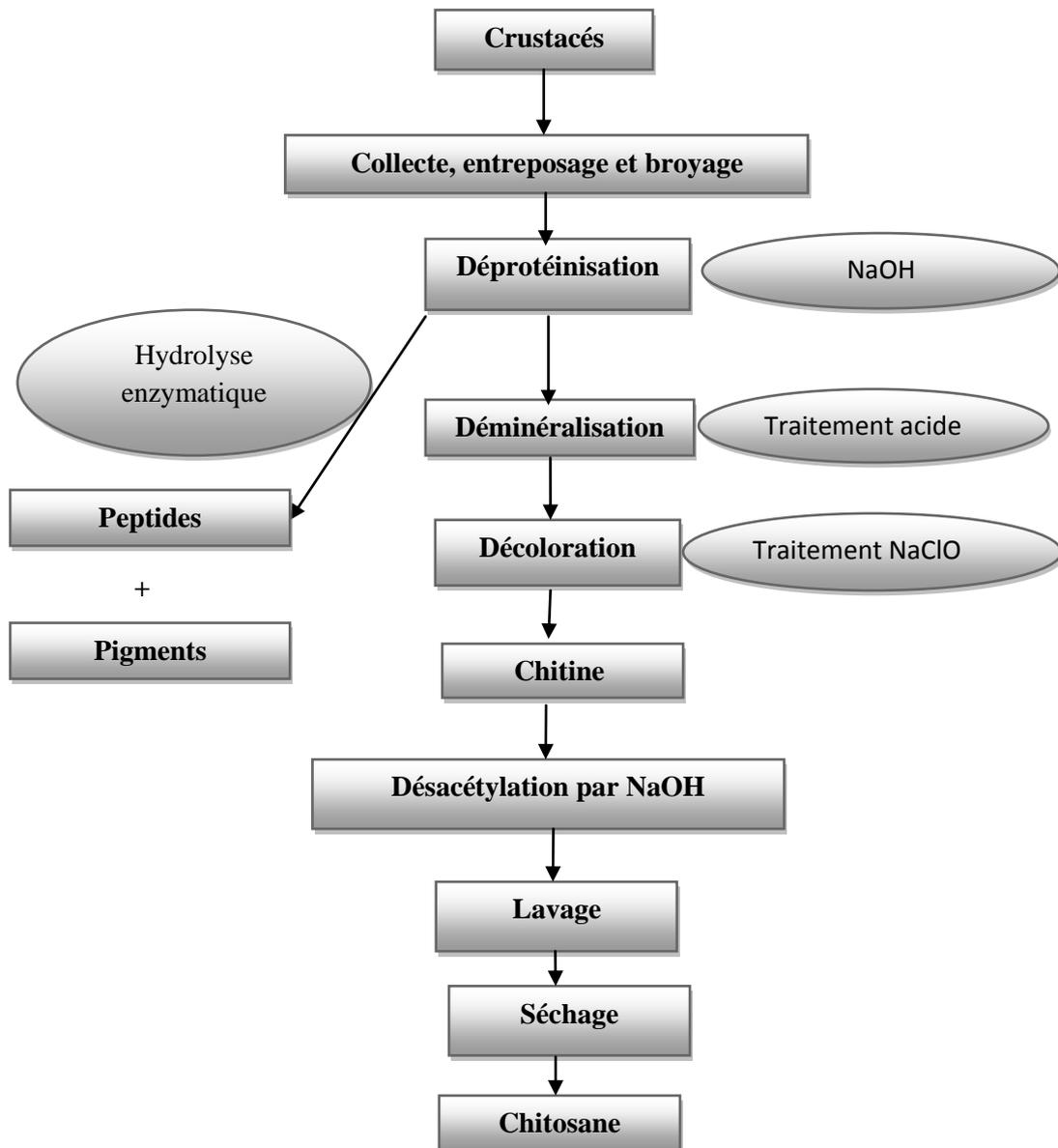


Figure II.3: Procédé de la fabrication de la chitine et du chitosane

II.6. Production de chitosane à partir de la chitine (Processus de désacétylation)

Il existe plusieurs méthodes de préparation du chitosane à partir de la chitine traitée (purifiée). Pour ce faire, il est nécessaire de désacétyler la chitine en hydrolysant les fonctions amide des unités acétylées.

➤ **Par voie chimique**

L'hydrolyse de la chitine se fait en milieu acide ou alcalin, le milieu acide est à éviter car les liaisons glucosidiques entre les unités sont sensibles à l'hydrolyse acide. Une des méthodes couramment utilisées (Mima et al. 1983) consiste à désacétyler la chitine dans une solution concentrée de NaOH (jusqu'à 50% en masse) sous atmosphère inerte (généralement N₂) pendant quelques heures à 110°C. Le chitosane obtenu est ensuite lavé avec de l'eau à 80°C jusqu'à pH neutre puis séché. L'atmosphère inerte est nécessaire afin d'éviter des réactions d'oxydation qui pourraient faire diminuer la taille des chaînes de chitosane. La concentration en soude permet quant à elle de moduler le degré de désacétylation du chitosane. Cette réaction peut être réalisée plusieurs fois de suite afin d'obtenir un DDA proche de 100%.

➤ **Par voie enzymatique**

De nombreuses études traitent la désacétylation enzymatique par l'action de chitinases ou chitosanylases. Elles sont extraites de levures telles que *Colletotrichum lindemuthianum* ou *Mucor rouxii* ou *Aspergillus niger*, où elles participent au métabolisme des sucres (Tsigos et Bouriotis, 1995 ; Gildberg et Stenberg, 2001). Les chitinases peuvent également être extraites de l'hépatopancréas de crevettes (Esaiassen et al. 1996). 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 présente un degré d'activité plus élevé lorsque le substrat présente une solubilité plus élevée. Après 13h de réaction à partir de chitosane pré-désacétylé (DA=42%), le DD est égale à 98% (Martinou et al. 1995, Martinou et al. 1998). *Aspergillus nidulans* est également une source de chitine désacétylase, ainsi que *Bacillus licheniformis*. À partir de cette souche, l'endochitinase extraite a été implantée dans *E. coli* pour produire une enzyme recombinante commercialisée. Elle est appliquée pour convertir la chitine colloïdale en N-acétylglucosamine et chitobiose à pH 4-6, à 50°C, 3 jours (Songsiriritthigul C et al. 2008).

II.7.Principales propriétés du chitosane

II.7.1.Propriétés chimiques

- ✓ Polyamine cationique
- ✓ Densité de charge élevée à pH<6,5
- ✓ Adhère à des surfaces chargées négativement

- ✓ Forme des gels avec les polyanions
- ✓ Large intervalle de masse moléculaire
- ✓ Peut former des solutions de différentes viscosités
- ✓ Chélate certains métaux de transition
- ✓ Contient des groupements réactifs d'amines et d'hydroxydes.

II.7.2. Propriétés biologiques

- ✓ Polymère d'origine naturelle
- ✓ Biodégradable
- ✓ Non toxique
- ✓ Hémostatique
- ✓ Anticancérigène.

II.8. Caractérisation physico-chimique du chitosane

II.8.1. Le degré de désacétylation (DD) ou le degré d'acétylation (DA)

Le chitosane est le dérivé non toxique N-désacétylé de la chitine, c'est-à-dire quand la chitine est suffisamment désacétylée pour qu'elle devienne soluble dans des solutions aqueuses d'acide acétique ou d'acide formique.

.En général, le degré de désacétylation de la chitine doit être au moins de 50% pour que l'on considère que l'on ait du chitosane. Ce paramètre (DA) influe sur toutes leurs propriétés physico-chimiques (masse molaire, viscosité, solubilité) et apparaît donc comme le plus important.

De nombreuses méthodes sont proposées afin de déterminer le DA sur des échantillons solides : la spectroscopie IR (Bugneront J et al.2001) l'analyse élémentaire (Kasaai M. R et al.1999) la RMN solide (Heux L et al.2000) ou sur des échantillons en solution : dosage UV (Maghami G. G et al.1988), titrage colloïdal (Chen R.H et al 1997) RMN liquide (Yang B.Y et al.2000) et titration potentiométrique (Rinaudo M et al.1999)

Cependant, la méthode la plus simple est celle de la spectroscopie IR proposée par Khan T et al.2000)

II.8.2. La viscosité

Pour caractériser le comportement viscosimétrique d'une solution de polymère, il existe différentes méthodes. La plus employée consiste à déterminer la viscosité intrinsèque du polymère

Certains problèmes peuvent apparaître lors de la mesure de la viscosité du chitosane. En effet, la présence possible de micro-gels ou d'agrégats favorisés par les liaisons hydrogène et hydrophobes, l'influence du vieillissement des solutions, et des effets électrostatiques (dus aux charges des groupements amine protonés) induisent des erreurs.

La viscosité du chitosane dépend de :

- son degré d'acétylation : plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amine libres, plus le chitosane est soluble et plus sa viscosité est importante
- sa concentration : la viscosité augmente en fonction de la concentration
- la température
- le pH : plus il est bas, plus la viscosité est forte.

II.8.3.La solubilité

En raison de sa solubilisation en solution acide, le chitosane se comporte comme un polyélectrolyte cationique de forte densité de charge. Ses propriétés dépendent du pH du milieu. Le chitosane est solubilisé et il devient cationique quand le pH est inférieur au pKa intrinsèque de la fonction amine du chitosane soit 6,3(Peter M.G, 1995) a un pH supérieur (>6,5), les groupements ne sont plus ionisés et le chitosane se précipite. Autour de pH 6, le nombre de fonctions amine libres devient suffisamment élevé pour induire une association des chaînes et la précipitation du polymère.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III: MATERIEL ET METHODES

Parmi les nombreux polymères naturels cités dans la bibliographie et rassemblés dans le mémoire de master de Belharet Y & Nezlioui K., 2012, on s'est intéressé au chitosane considéré comme 1^{er} dérivé de la chitine extraite des crustacés ou des basidiomycètes. En raison du prix élevé du chitosane commercial d'une part, et sa disponibilité d'autre part, on s'est proposé de le préparer au laboratoire (BIOGEP de l'Ecole Nationale Polytechnique en collaboration avec le laboratoire de l'équipe Ingénierie et Génie des Procédés de l'Ecole Nationale Supérieure de Rennes, France) à partir de la chitine des carapaces des crevettes pêchées sur le littoral algérien : *Parapenaeus longirostris*. Cette étape fait partie des l'un des objectifs fixés dans le du programme national de la recherche PNR intitulé: suivi et optimisation de la qualité des eaux du barrage de Taksebt, dont le code est: 4/E164/4027 et dirigé par Adour L. (2010). Après purification de la chitine effectuée à partir des crevettes par deux voies: chimique et biologique, et dont l'étude a été réalisée par Kadouche S. (2013) (nommée ChitiChim) et par Arbia W. (2013) (nommé ChitiBio), respectivement, la désacétylation homogène en milieu basique a été expérimentée pour les 02 chitines désacétylées et des cinétiques de désacétylation ont été suivies à deux températures 23°C et 30°C, choisies car sont voisines de la température ambiante. L'objectif fixé dans ce travail est la caractérisation des différentes chitines DA à 23°C et à 30°C et à différents temps de DA (10-23jours). Pour cela, on s'est intéressé à deux paramètres intrinsèques importants chez le chitosane à savoir : le degré de désacétylation (DDA) et le poids moléculaire viscosimétrique (PM). Les résultats de cette étude vont nous permettre de confirmer que les conditions opératoires de désacétylation dites conditions douces (40% NaOH, rapport chitine/base=1g/50ml, sans agitation, température ambiante (23-30°C) sont envisagées dans la préparation des chitosanes solubles dans 1% d'acide acétique. Une comparaison des différents chitosanes préparés ont été effectués avec le ChitosCom (Fluka).

III. Matériel et méthodes expérimentales

III.1. Matériels

III.1.1. Produits utilisés

Les différentes chitines DA testées dans cette étude sont décrites dans le tableau IV.1.

Tableau III.1: conditions opératoires de préparation des différentes chitines désacétylées

	T ^{ure} de désacétylation	La durée de DA (jour)	Notation de la chitine DA
Chitine biologique (Arbia W., 2013) désacétylée (ChitiBio DA)	23°C	11	ChitiBio DA11T23
		13	ChitiBio DA13T23
		21	ChitiBio DA21T23
	30°C	10	ChitiBio DA10T30
		15	ChitiBio DA15T30
		20	ChitiBio DA20T30
Chitine chimique désacétylée (Kadouche S., 2013) (ChitiChim DA)	23°C	11	ChitiChim DA11T23
		15	ChitiChim DA15T23
		20	ChitiChim DA20T23
	30°C	10	ChitiChim DA10T30
		15	ChitiChim DA15T30
		23	ChitiChim DA23T30
Chitine commerciale (Fluka) désacétylée (ChitiCom DA)	30°C	10	ChitiCom DA10T30
		15	ChitiCom DA15T30
		23	ChitiCom DA23T30

- Chitine commerciale (Fluka)
- Acide acétique (CH₃COOH) concentré à 99%
- Acétone

III.1.2. Petits matériels

- Verrerie de laboratoire (fioles jaugées, béchers, pipette, pro-pipette, tubes à essai, flacons)
- Barreau magnétique

III.1.3. Appareillages

- Viscosimètre à bille de type C de HAAKE-THERMO
- Tube capillaire
- pH- mètre HANA (portable)
- Agitateur magnétique (MR 3001 K)
- Balance de précision, de marque LAC 114, précision de 0,1mg
- Microscope électronique à balayage de type ESEM XL30, marque PHILIPS
- Spectrophotomètre infrarouge de marque BRUKER (Tensor27)
- Etuve

III.2.Méthodes

III.2.1. Caractérisation des chitines désacétylées à température 23°C et 30°C

III.2.1.1. Test de solubilité

L'une des caractéristiques du chitosane par rapport à la chitine est sa solubilisation en milieu acide dilué, l'acide le plus fréquemment utilisé est l'acide acétique (Gregorio et al, 2009). En général, le chitosane est parfaitement soluble à pH 3-4 mais également soluble dans des solutions diluées (0,1-1%) d'acide nitrique et d'acide chlorhydrique. En effet, les groupements aminés (NH_2) du chitosane sont protonés à partir du pH 3-4 et le polymère chargé positivement (NH_3^+) devient soluble. Grâce à cette propriété, il est possible de confirmer avec certitude que les produits préparés sont du chitosane (Austin, 1984).

Dans cette étude, 50mg de chitines désacétylées ont été solubilisés dans 50ml d'acide acétique à 1%.

III.2.1.2. Détermination du DDA des chitines désacétylées par spectroscopie infrarouge (FTIR)

Les techniques de spectroscopie Infrarouge sont utilisées pour la détermination des groupements fonctionnels permettant de figurer la structure. Chaque liaison présente des vibrations caractéristiques de fréquences bien déterminées.

Dans les conditions normales de température et de pression, les atomes et groupements fonctionnels, constituant la matière, sont animés de mouvements vibratoires. Si ces constituants sont exposés à un rayonnement électromagnétique dont la fréquence est proche de celle de l'une ou l'autre de leurs vibrations propres, ils entrent en résonance, empruntant pour ce faire, de l'énergie dans le faisceau incident. Il y a alors absorption d'énergie.

Sous l'effet d'un rayonnement électromagnétique infrarouge, les liaisons moléculaires absorbent une partie de cette énergie et vibrent selon des mouvements de différents types (vibrations d'élongation ou de déformation). Le domaine infrarouge, dans lequel se trouvent les énergies de vibration des liaisons moléculaires, est divisé en trois zones :

- proche infrarouge : $\lambda = 0,8$ à $2,5$ mm (ou $\nu = 4000$ à 12500 cm^{-1}).
- moyen infrarouge : $\lambda = 2,5$ à 25 mm (ou $\nu = 400$ à 4000 cm^{-1}).
- lointain infrarouge : $\lambda = 25$ à 1000 mm (ou $\nu = 10$ à 400 cm^{-1}).

Les analyses ont été effectuées au laboratoire de chimie de coordination de l'UMMT à l'aide d'une spectroscopie Infrarouge de type BRUKER (SENSOR27). Le spectre obtenu a été enregistré entre 4000 et 500 cm⁻¹. Avant l'analyse spectroscopique, les échantillons ont été portés dans l'étuve à 40°C pendant 24 heures.

La méthode la plus simple et la plus rapide pour calculer le degré DDA est celle de la spectroscopie IR proposée par Khan et *al* (2000).

Le degré DDA des chitines DA a été déterminé en utilisant la formule suivante (Brugnerotto et *al.*, 2001)

$$DDA = 100 - \left[\frac{(A_{1320}/A_{1420})^{-0,3822}}{0,03233} \right] \quad (1)$$

A₁₃₂₀ : absorbance à 1320cm⁻¹ correspondant à l'amide III.

A₁₄₂₀ : absorbance à 1420cm⁻¹ correspondant à la déformation symétrique de CH₃ et CH₂.

Brugnerotto et *al.* 2001 ont signalé que le DDA déterminé à partir du ratio A₁₃₂₀/A₁₄₂₀ se rapproche avec le DDA déterminé à partir de la RMN (¹H) et les spectres RMN (¹³C) pour toute la gamme des DDA. L'explication donnée est que les intensités et les positions des bandes apparues à 1320 cm⁻¹ et 1420 cm⁻¹ n'ont pas changé avec l'humidité et les liaisons hydrogène.

III.2.1.3. Détermination du poids moléculaire des chitines désacétylées par viscosimétrie

Le poids moléculaire d'un échantillon de chitosane est calculé à partir de sa viscosité intrinsèque notée [η] en appliquant la relation de Mark-Houwink-Sakurada (Rinaudo et *al.*, 1993).

$$[\eta] = K M_v^a \quad (2)$$

[η] : viscosité intrinsèque (dL/g).

M_v : poids moléculaire moyen viscosimétrique du polymère (Da).

K et a : paramètres qui dépendent du système polymère-solvant à une température donnée.

Dans notre étude, on a utilisé T=30°C, a=0,72, K=4,74×10⁻⁵g/dl (Kasaai, 2007).

On détermine [η] en mesurant la viscosité dynamique η de la solution et celle du solvant pur η₀

telle que la viscosité spécifique s'écrit:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \quad (3)$$

Le tracé des graphes de la viscosité inhérente ou de la viscosité réduite en fonction de la concentration de la solution de chitosane (0,02-0,1g/dL) permet de déduire $[\eta]$ (correspondant à l'ordonnée à l'origine de la droite voir annexe) par:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (4)$$

$$\eta_{inh} = \frac{\ln \eta_{rel}}{c} \quad (5)$$

La viscosité relative s'écrit:
$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} \quad (6)$$

C: concentration en polymère (g/dL)

- La viscosité intrinsèque de ChitosCom (Fluka) est déterminée par deux méthodes
 - ✓ viscosimètre à bille
 - ✓ tube capillaire
- La viscosité intrinsèque des chitines DA est déterminée expérimentalement à l'aide du viscosimètre à bille.

a) La méthode de calcul de la viscosité dynamique par viscosimétrie à bille est basée sur la mesure du temps nécessaire à une bille pour chuter d'une distance définie. Les mouvements de rotation et de glissement de la bille à travers l'échantillon remplissant un tube de mesure cylindrique légèrement incliné sont décrits par le temps de chute (Photo III). La viscosité dynamique est exprimée à l'aide de l'unité absolue standardisée internationale de "milli Pascal-secondes" (mPa.s).

La viscosité dynamique η est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\eta = k \times (\rho_1 - \rho_2) \times t \quad (7)$$

Où :

K = constante de bille (mPa.s.cm³/g.s)

ρ_1 = densité de la bille en (g/cm³)

ρ_2 = densité du liquide à mesurer à la température de mesure (g/cm³)

t = temps de chute de la bille (secondes)

Les masses volumiques des solutions ont été déterminées à l'aide d'un pycnomètre (10ml) à une température donnée (30°C).

Avec: $\rho_2 = \frac{M}{V}$ (8)



Photo III: Photo d'un viscosimètre à bille

b) La méthode de calcul de la viscosité dynamique par un viscosimètre capillaire est réalisée grâce à un tube à viscosité (Figure III.1) par la mesure du temps d'écoulement d'un même volume de solvant (AA à 1%) ou de la solution de ChitosCom (Fluka) contenu entre les deux points (a) et (b) à l'aide d'un chronomètre.

L'équation est donnée par:

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \quad (9)$$

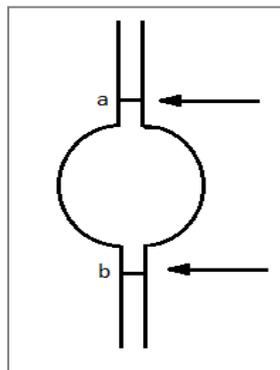


Figure III.1 : tube à viscosité

III.2.1.4 Microscopie électronique à balayage (MEB)

✓ Principe

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique basée sur le principe des interactions électrons-matière, capable de produire des images en haute résolution de la

surface d'un échantillon. Le principe du MEB consiste sur l'émission d'un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet des électrons et des photons. Ainsi, un faisceau d'électrons primaire frappe la surface de l'échantillon et les photons réémis sont remplacés par tout un spectre de particules ou par rayonnements : électrons secondaires, électrons rétrodiffusés, électrons des rayons X.

Ces particules ou rayonnements apportent différents types d'informations sur la matière dont est constitué l'échantillon. La qualité des images obtenues en microscopie électronique à balayage dépend grandement de la qualité de l'échantillon analysé.

L'objectif des observations MEB réalisées dans le cadre de ce mémoire était d'observer la morphologie des chitines préparées (par voie biologique et chimique) et celle des chitines désacétylées.

Ainsi, les photographies obtenues en microscopie électronique à balayage du type PHILIPS ESEM XL30 avec des grossissements différents, ont été réalisées au laboratoire (Microscopie Electronique à Balayage) de l'Université Mouloud Mammeri.

CHAPITRE IV: RESULTATS ET DISCUSSION

Cette partie présente les résultats expérimentaux obtenus au cours de cette étude, ainsi que les interprétations et discussion portant sur la caractérisation des différentes chitines désacétylées à températures 23°C et 30°C.

IV.1. Test de solubilité

Durant la mise en solution des différentes chitines désacétylées (lavées et séchées à 50°C) dans de l'acide acétique à 1%, il a été constaté comme le montre la photo IV. Qu'il y a eu solubilité de tous les produits (tableau IV.1) ce qui se traduit par la présence effective du chitosane. Les conditions de traitement alcalin, adoptées dans cette étude : 40% NaOH, rapport Chitine/Base=1g/50ml, sans agitation, température 23°C et 30°C, ont montré qu'il était possible d'obtenir du chitosane entre 10 jours et 23 jours, à deux températures 23°C et 30°C (choisies car proches de la température ambiante) et à partir de 3 chitines : la ChitiBio préparée par voie biologique (Arbia et al., 2013), la ChitiChim préparée par voie chimique (Kadouche S., 2013) et la ChitiCom (Fluka).

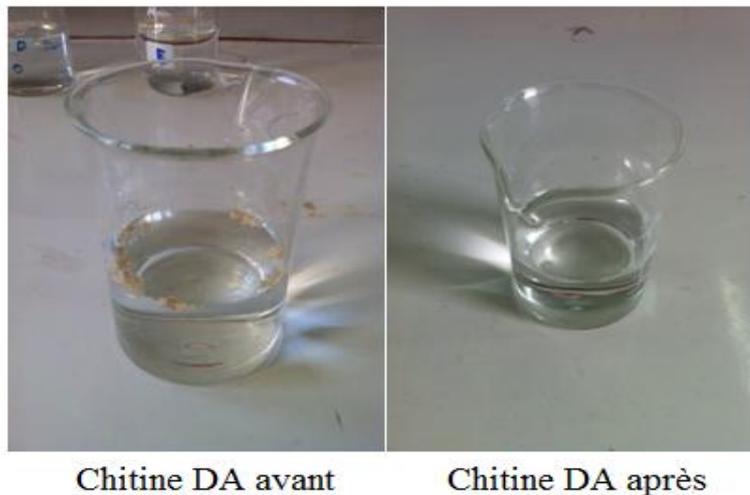


Photo IV : *La solubilité d'une chitine avant et après désacétylation*

Ce test, rapide et simple, a permis de montrer que la désacétylation basique et homogène des différentes chitines pouvait être réalisée dans les conditions totalement différentes de celles mentionnées dans la bibliographie ((Mima et al. 1983) consiste à désacétyler la chitine dans une solution concentrée de NaOH (jusqu'à 50% en masse) sous atmosphère inerte (généralement N₂)). Ces nouvelles conditions sont considérées plus douces, elles respectent l'environnement (car concentration en NaOH plus faible) et elles consomment moins d'énergie.

Tableau IV.1 : Test de solubilité des différentes chitines désacétylées

Test de solubilité des ChitiBio DAT23		
temps (jours)	Solubilité des ChitiBio DAT23 dans le solvant AA à 1% (pH=2,8)	pH de la solution
11	soluble	3,00
13	soluble	3,4
21	soluble	3,43
Test de solubilité des ChitiBio DAT30		
temps (jours)	Solubilité des ChitiBio DAT30 dans le solvant AA à 1% (pH=2,8)	pH de la solution
10	soluble	3,06
15	soluble	3,03
20	soluble	3,02
Test de solubilité de ChitiChim DAT23		
temps (jours)	Solubilité des ChitiChim DAT23 dans solvant AA à 1% (pH=3,12)	pH de la solution
11	soluble	3,51
15	soluble	3,46
21	soluble	3,48
Test de solubilité de ChitiChim DAT30		
temps (jours)	Solubilité des ChitiChim DAT30 dans solvant AA à 1% (pH=3,12)	pH de la solution
11	soluble	3,54
15	soluble	3,58
23	soluble	3,55
Test de solubilité de ChitiCom DAT30		
temps (jours)	Solubilité des ChitiCom DAT30 dans le solvant AA à 1% (pH=3)	pH de la solution
11	soluble	3,21
15	soluble	3,34
23	soluble	3,38

IV.2. Détermination du DDA des chitines désacétylées par spectroscopie infrarouge (FTIR)

Le spectre de la chitine purifiée par voie biologique (Figures IV.1 et IV.2) est identique à celui de la chitine purifiée par voie chimique (Figures IV.3 et IV.4) et de la chitine commerciale (Figure IV.5). Les principaux pics caractéristiques de la chitine sont : 1650cm^{-1} correspondant à l'amide I, 1583cm^{-1} à l'amide II, 1420 à la déformation symétrique de $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2$, 1320 à, 3200cm^{-1} à et 3100cm^{-1} à la liaison d'hydrogène intermoléculaire $(\text{C})_{(6)}\text{OH}\cdots\text{OH}-\text{C}_{(6)}$.

➤ Les spectres obtenus des ChitiBio DAT30 à 10 jours, à 15 jours et à 20 jours (Figure V.1) et des ChitiBio DAT23 à 11 jours, à 13 jours et à 21 jours (Figure IV.2) montrent une diminution de l'intensité de tous les pics et principalement ceux situés à 1650cm^{-1} et à 1550cm^{-1} et la disparition de deux pics situés à 3200cm^{-1} et 3100cm^{-1} . Les spectres des ChitiBio DA sont semblables à celui du ChitosCom (Fluka). Ces résultats confirment que les ChitiBio désacétylées entre 10 jours et 23 jours à 23°C et à 30°C sont bien des chitosanes.

➤ Les spectres obtenus des ChitiChim DAT30 à 10 jours, à 15 jours et à 20 jours (Figure V.3) et des ChitiBio DAT23 à 11 jours, à 15 jours et à 21 jours (Figure IV.4) montrent une diminution de l'intensité de tous les pics et principalement ceux situés à 1650cm^{-1} et à 1550cm^{-1} et la disparition de deux pics situés à 3200cm^{-1} et 3100cm^{-1} . Les spectres des ChitiChim DA sont semblables à celui du ChitosCom (Fluka). Ces résultats confirment que les ChitiChim désacétylées entre 10 jours et 23 jours à 23°C et à 30°C sont bien des chitosanes.

➤ Les spectres obtenus des ChitiCom DAT30 à 10 jours, à 15 jours et à 20 jours (Figure V.5) montrent une diminution de l'intensité de tous les pics et principalement ceux situés à 1650cm^{-1} et à 1550cm^{-1} et la disparition de deux pics situés à 3200cm^{-1} et 3100cm^{-1} . Les spectres des ChitiCom DA sont semblables à celui du ChitosCom (Fluka). Ces résultats confirment que les ChitiCom désacétylées entre 10 jours et 23 jours à 23°C et à 30°C sont bien des chitosanes.

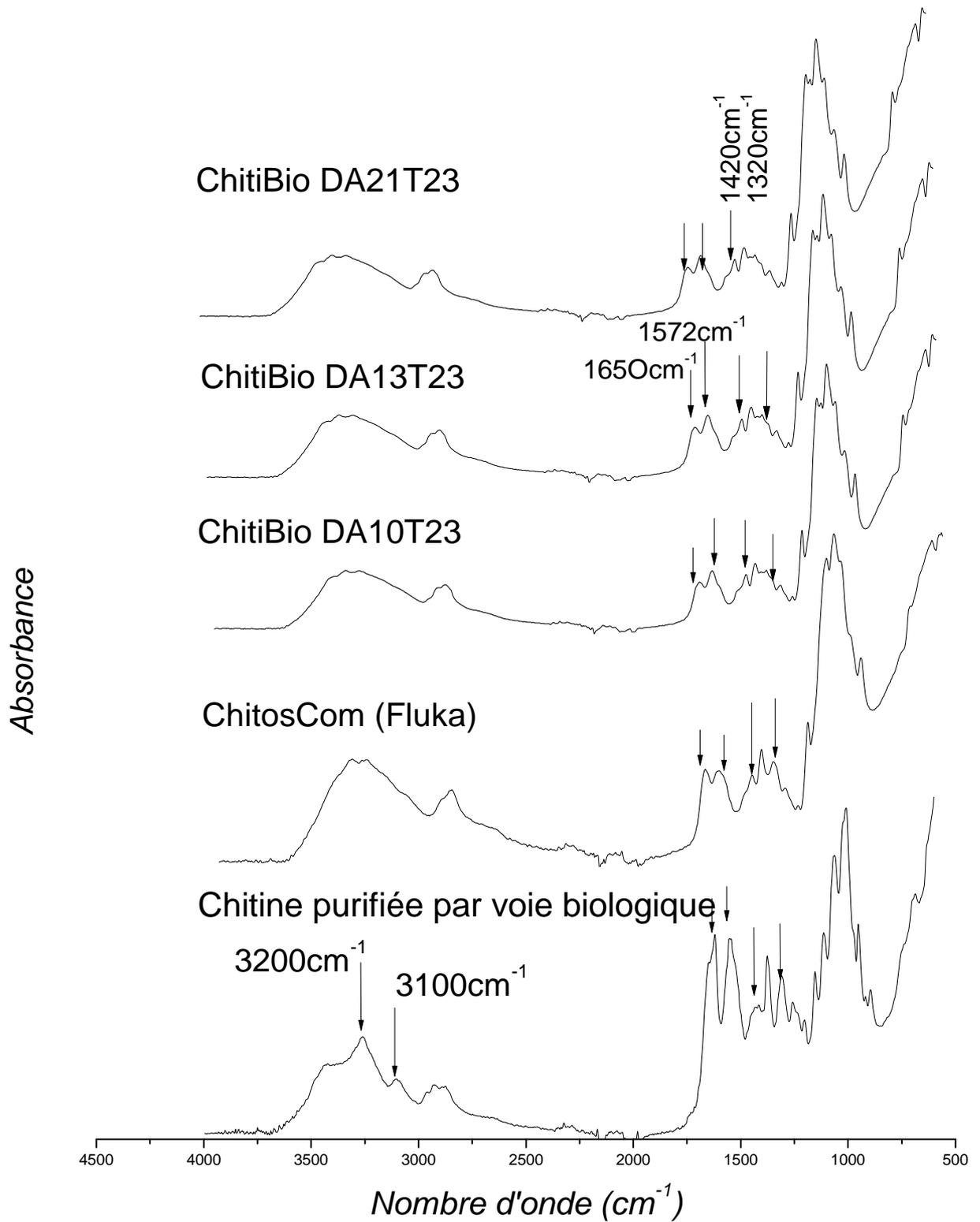


Figure IV.1 : les spectres FTIR des ChitiBio DAT23, Chitine purifiée par voie biologique et ChitosCom (Fluka).

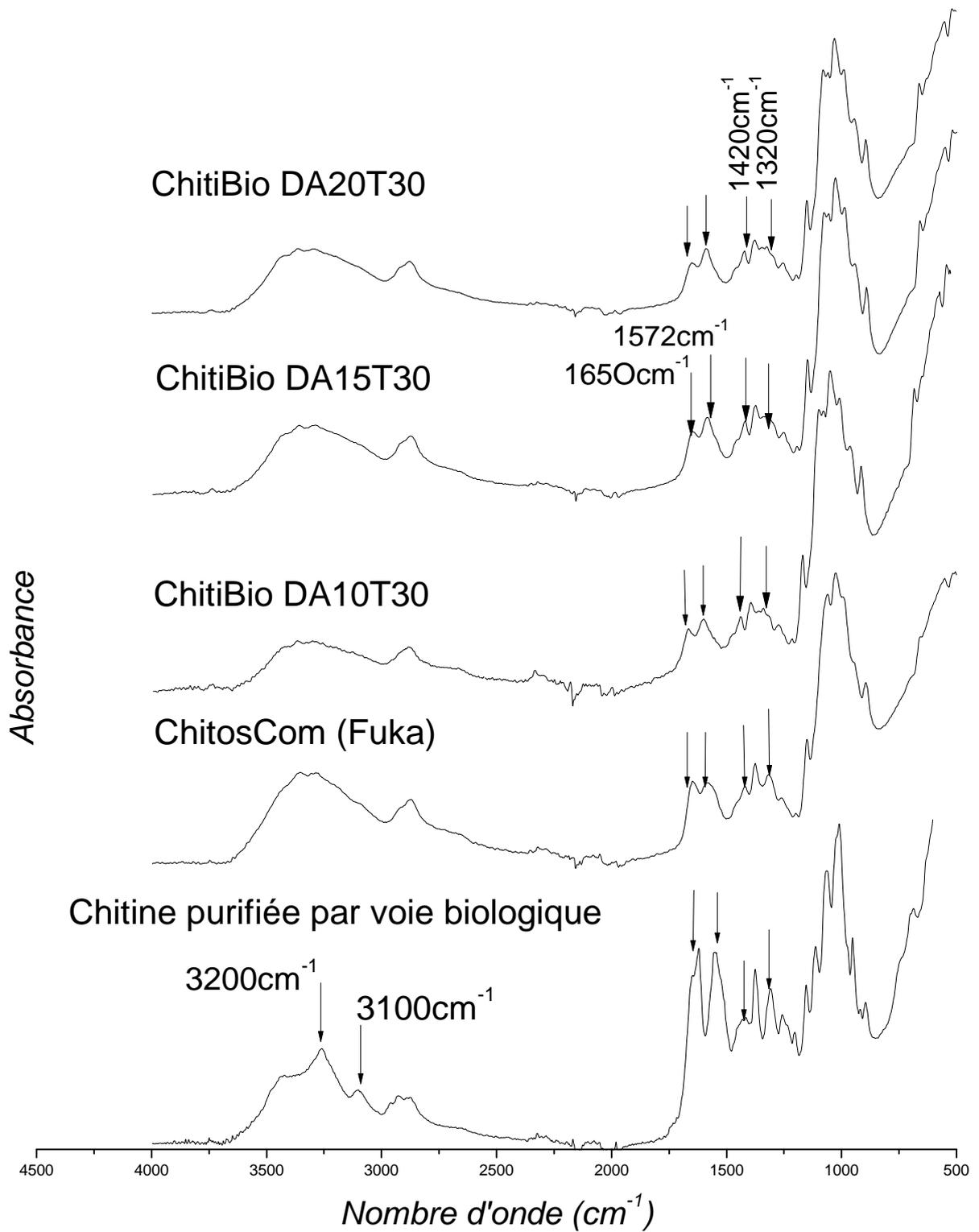


Figure IV.2 : les spectres FTIR des ChitiBio DAT30, Chitine purifiée par voie biologique et ChitosCom (Fluka).

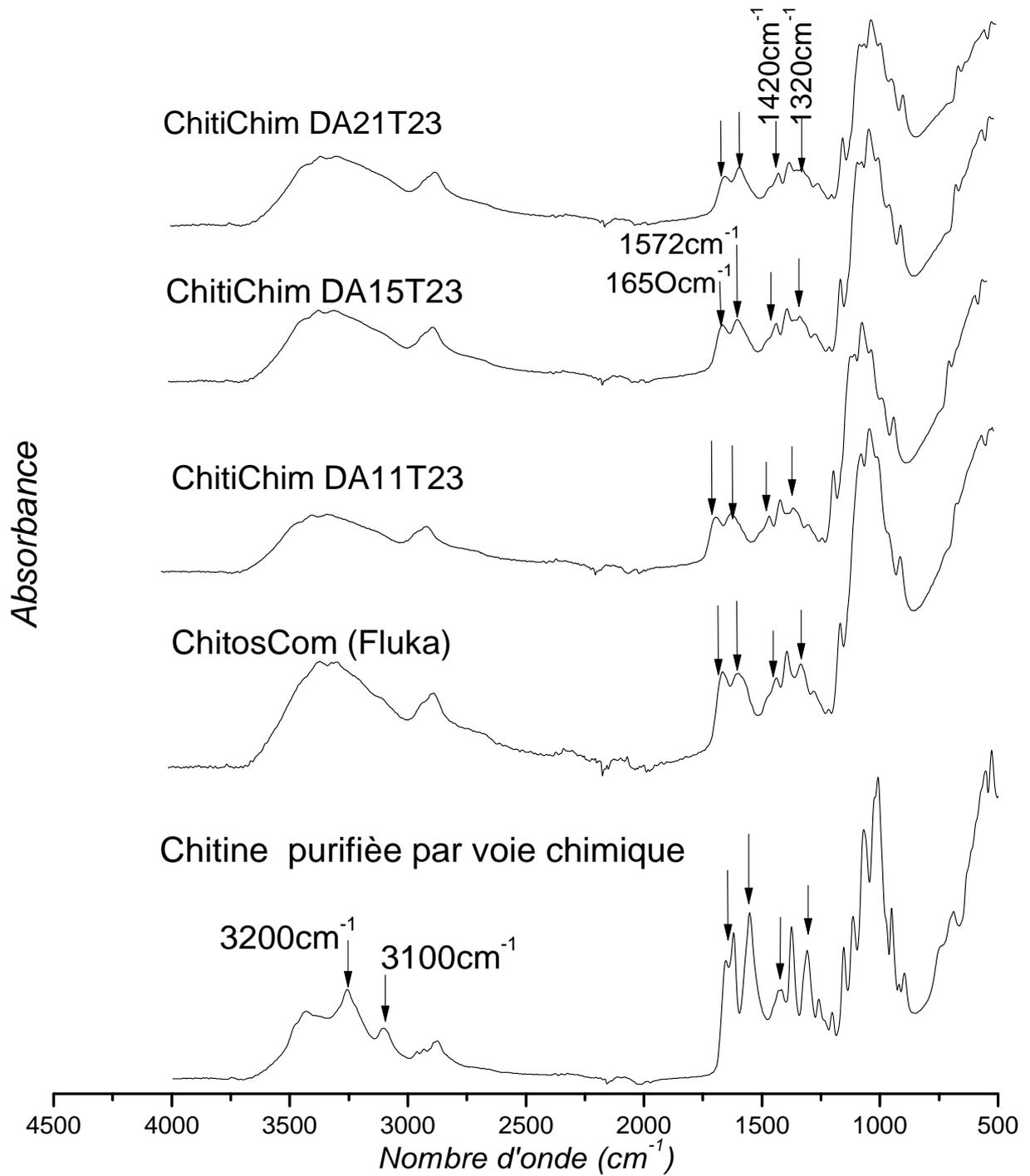


Figure IV.3 : les spectres FTIR des ChitiChim DAT23, Chitine purifiée par voie chimique et ChitosCom (Fluka).

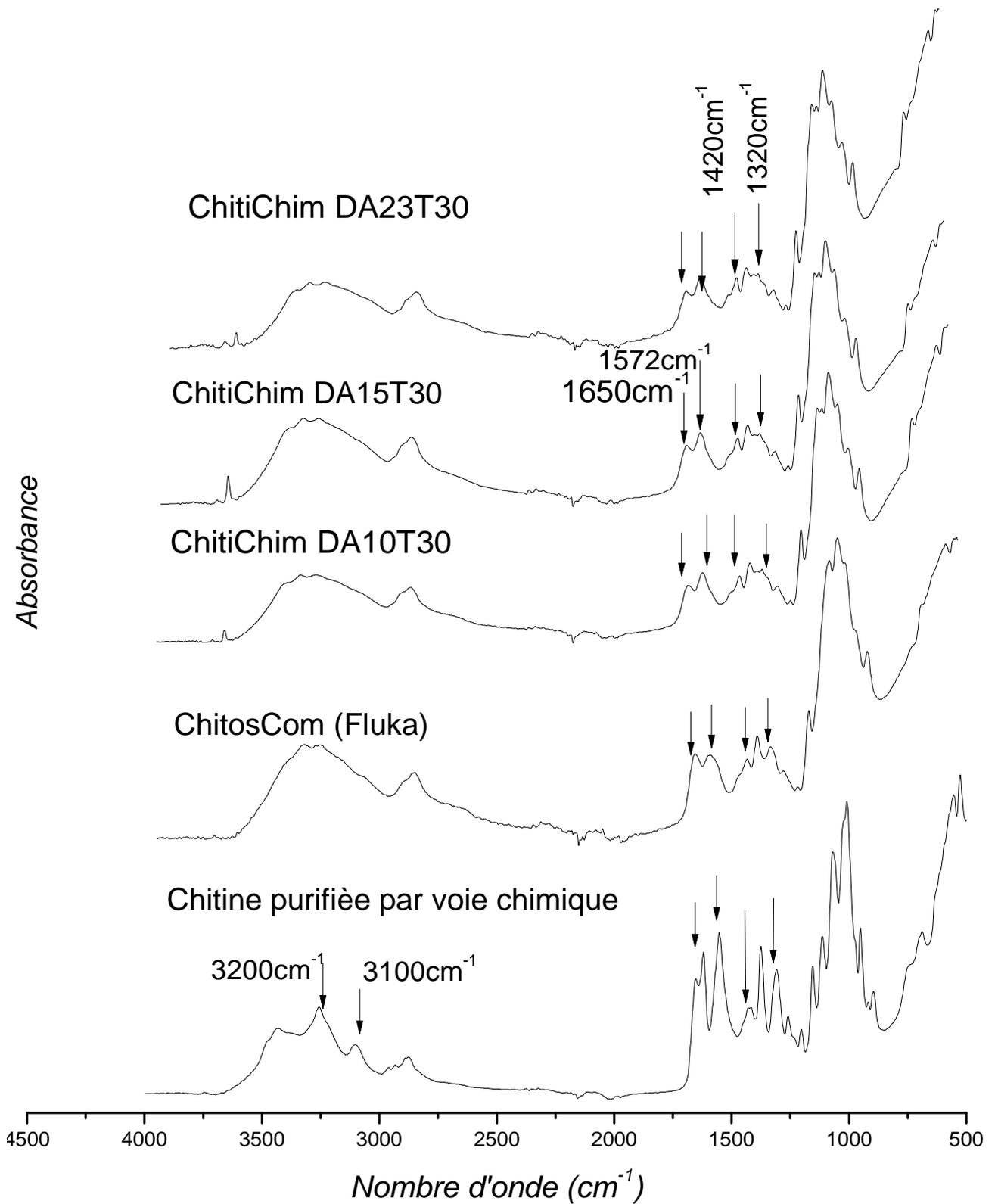


Figure IV.4 : les spectres FTIR des ChitiChim DAT30, Chitine purifiée par voie chimique et ChitosCom (Fluka).

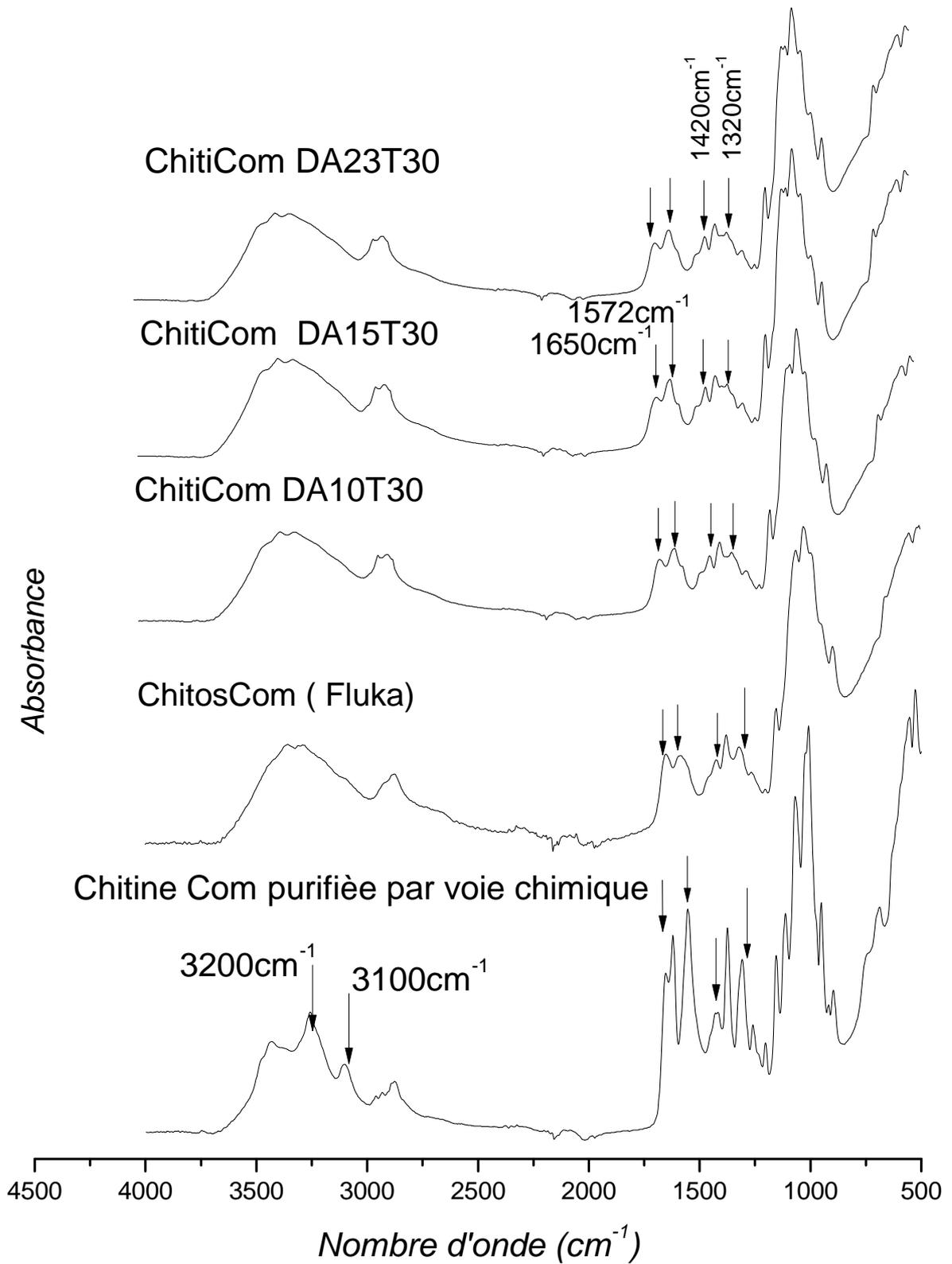


Figure IV.5 : les spectres FTIR des ChitiCom DAT30, ChitineCom purifiée par voie chimique et ChitosCom (Fluka).

Le calcul du degré de désacétylation (DDA) de chacune des chitines désacétylées a été effectué et les résultats ont été rassemblés dans la Figure IV.6. Il est constaté qu'entre 10 jours et 23 jours, les degrés DDA de toutes les chitines désacétylées à 30°C et à 23°C sont supérieurs à 50% et elles sont toutes comprises entre 76% et 82%. Il est aussi remarqué que toutes les chitines DA possèdent un DDA supérieur à celui du chitosane commercial (Fluka) et qui est de 75%. Ceci démontre que les conditions « douces » de désacétylation utilisées dans cette étude ont permis de produire un nombre important de groupements -NH₂ libres. Ces résultats démontrent encore une fois que les différentes Chitines DA sont des chitosanes.

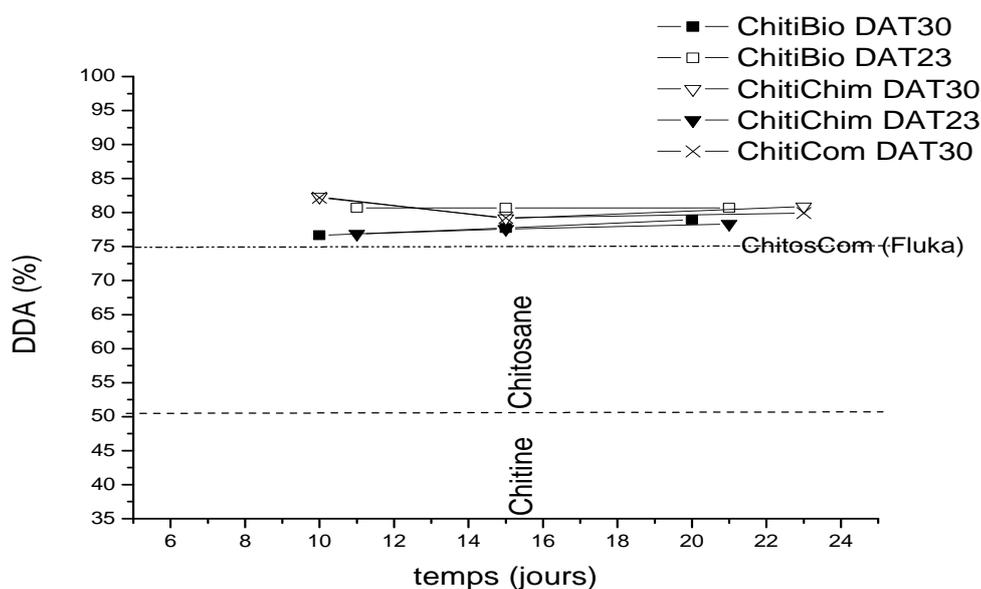


Figure IV.6 : Evolution du degré DDA en fonction du temps pour les différentes chitines désacétylées à 23°C et 30°C

IV.3. Détermination du poids moléculaire des chitines désacétylées par viscosimétrie

Pour chaque chitine désacétylée à différentes températures et à différents temps, le calcul graphique de la viscosité intrinsèque (par le viscosimètre à bille) (présenté en annexes) montre que les valeurs varient entre 10,5 et 55 dL/g selon le mode de purification ainsi que les conditions de désacétylation de la chitine. Dans la formule de Mark-Houwink-Sakurada (Rinaudo et al., 1993), la détermination de PM se fait connaissant la viscosité intrinsèque de l'échantillon calculé par le tube capillaire. Dans ce travail, il a été donc proposé de recalculer la viscosité intrinsèque (valeur obtenue si calculée par le tube capillaire) de chaque échantillon en prenant le chitosane commercial (pur) comme étalon. Autrement dit, déterminer la viscosité intrinsèque du chitosane commercial (Fluka) en mesurant la viscosité spécifique dans l'intervalle de concentration de 0,2 à 1g/dL par le tube capillaire et dans

l'intervalle de concentration de 0,02 à 0,1g/dL par le viscosimètre à bille. Les résultats sont rassemblés dans le tableau IV.2 : pour le ChitosCom (Fluka), il est trouvé que la valeur de la viscosité intrinsèque diffère selon la méthode adoptée : elle est de 0,6 dL/g par tube capillaire et 38 dL/g par viscosimètre à bille. Pour les autres chitines DA, la viscosité intrinsèque a été recalculée puis le poids moléculaire a été obtenu. Les résultats montrent que ce dernier est variable (entre 75 et 750KDa) selon la nature de la chitine désacétylée. Afin de mieux élucider le PM, le tracé du graphe de ce dernier en fonction de la durée de désacétylation pour chaque chitine désacétylée à 23°C et à 30°C a été représenté dans la Figure IV.8.

Tableau IV.2 : Les viscosités intrinsèques et les poids moléculaire de chaque chitine désacétylée à 23 et à 30 °C

ChitosCom (Fluka)			
[η] (dL/g) (tube capillaire)	[η] (dL/g) (viscosimètre à bille)	PM(KDa) (calculée)	PM (KDa) (donnée commerciale)
0,558	37,922	450,401	400
ChitiBio DAT23			
t (jours)	[η] (dL/g) (viscosimètre à bille)	[η] (dL/g) (tube capillaire)	PM(KDa)
11	32,071	0,472	354,260
15	29,928	0,440	321,835
21	29,701	0,437	318,451
ChitiBio DAT30			
t (jours)	[η] (dL/g) (viscosimètre a bille)	[η] (dL/g) (tube capillaire)	PM(KDa)
10	37,198	0,547	434,857
15	35,434	0,521	406,434
20	38,674	0,569	459,320
ChitiChim DAT23			
t (jours)	[η] (dL/g) (viscosimètre a bille)	[η] (dL/g) (tube capillaire)	PM(KDa)
11	47,806	0,703	570,940
15	47,709	0,702	614,806
21	55,159	0,812	751,987
ChitiChim DAT30			
t (jours)	[η] (dL/g) (viscosimètre à bille)	[η] (dL/g) (tube capillaire)	PM(KDa)
10	29,520	0,434	315,400
15	32,079	0,472	354,360
23	32,313	0,475	357,500
ChitiCom DAT30			
t (jours)	[η] (dL/g) (viscosimètre à bille)	[η] (dL/g) (tube capillaire)	PM(KDa)
10	16,859	0,248	145,101
15	16,092	0,237	136,026
23	10,492	0,154	75,122

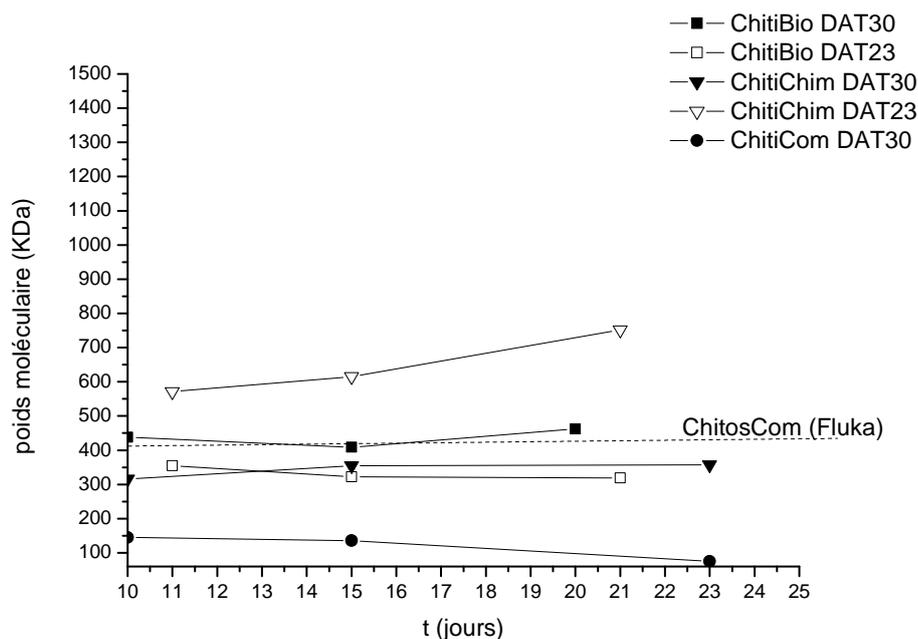


Figure IV.7 : Le poids moléculaire des différentes chitines DA à différents temps de désacétylation et à différentes températures

D'après la Figure IV.8, il est constaté qu'entre 10 jours et 23 jours, les valeurs de PM des ChitiBio DAT23 et ChitiBio DAT30 ainsi que les ChitiChim DAT30 sont toutes comprises entre 318 et 462 KDa. Ces résultats démontrent que les différents chitosanes préparés (ChitiBio 10DAT23, ChitiBio 15DAT23, ChitiBio 20DAT23,.....) possèdent un poids moléculaire proche de celui du ChitosCom (Fluka) (400KDa).

Avec les ChitiChim DAT23, on a obtenu des chitosanes de faible poids moléculaire compris entre 75 et 135 KDa et avec les ChitiCom DAT30, on a obtenu par contre des chitosanes de poids moléculaire élevé compris entre 500 et 750 KDa.

IV.4. Observation par microscopie électronique à balayage (MEB) des chitines désacétylées à 23°C et à 30°C

Nos échantillons ont été analysés par microscopie électronique à balayage MEB, cette méthode de caractérisation va nous permettre d'observer la morphologie de la surface de la carapace brute de crevettes, de la chitine purifiée par voie biologique puis des différentes chitines DA. Les morphologies de la chitine commerciale (Fluka) et du chitosane commercial (Fluka) ont aussi été réalisées afin de les comparer avec celles des chitines DA.

IV.4.1. La morphologie de la carapace brute de crevettes (*Parapenaeus longirostris*)

Les photographies de la Figure IV.9 représentent la morphologie de la carapace brute des crevettes avant la déminéralisation et la déprotéinisation. Elles montrent la présence de cristaux répartis de façon hétérogène dans l'échantillon. D'après la composition de la carapace des crustacés, ils correspondent aux minéraux et principalement le carbonate de calcium (CaCO_3). Avec le grossissement $\times 5000$ ou $\times 10000$, des fibrilles ont été observées et elles correspondent à la chitine associée aux protéines. La présence de « trous » sur la surface démontre l'existence des pores dans la carapace.

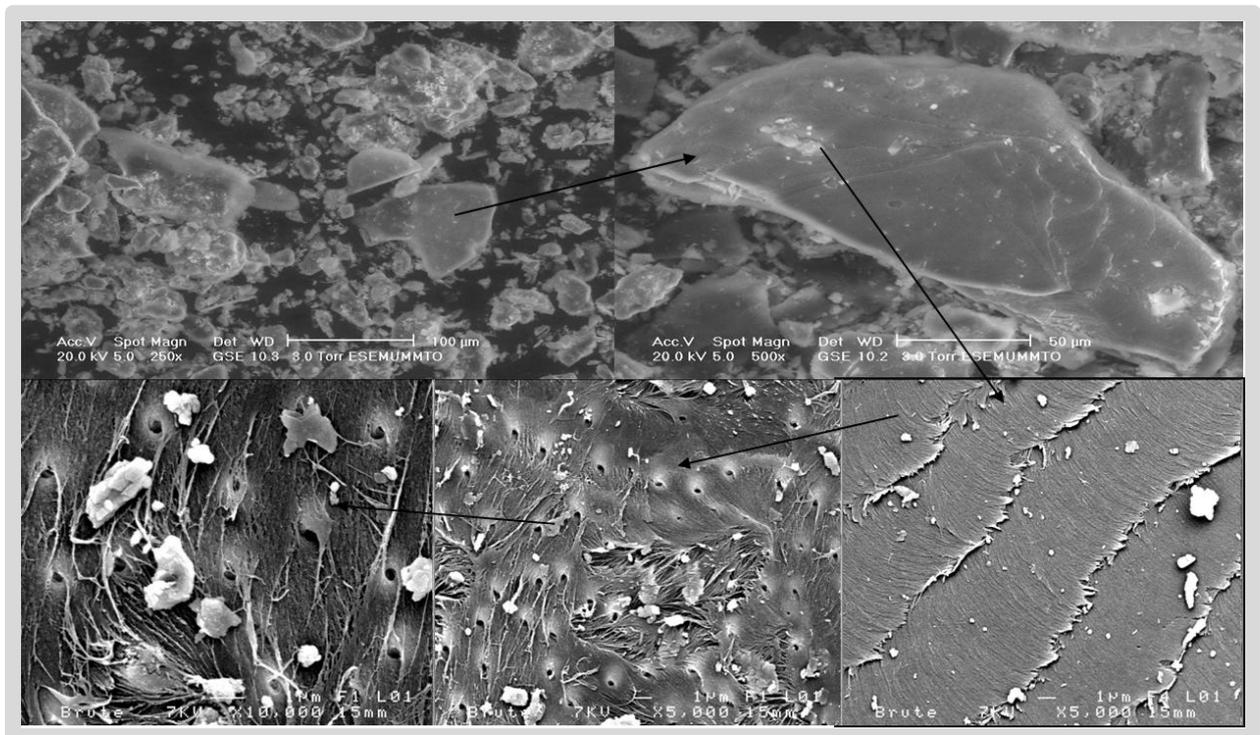


Figure IV.8 : Micrographies MEB de la carapace brute de crevettes (*Parapenaeus longirostris*)

IV.4.2. La morphologie de la chitine purifiée par voie biologique (Arbia W., 2013)

La chitine purifiée par voie biologique se présente sous forme de fibrilles (Figure IV.10) comparable à la chitine commerciale (Fluka) présentée sous forme de poudre fine et prise comme standard (Figure IV.11). Le traitement par la bactérie *Lactobacillus helveticus* a permis d'éliminer les minéraux ainsi que les protéines présents dans la carapace de crevettes *Parapenaeus longirostris*. Par conséquent, la chitine se trouve libre. On remarque que quelques cellules bactériennes restent encore dans le résidu malgré le lavage répété à l'eau distillée.

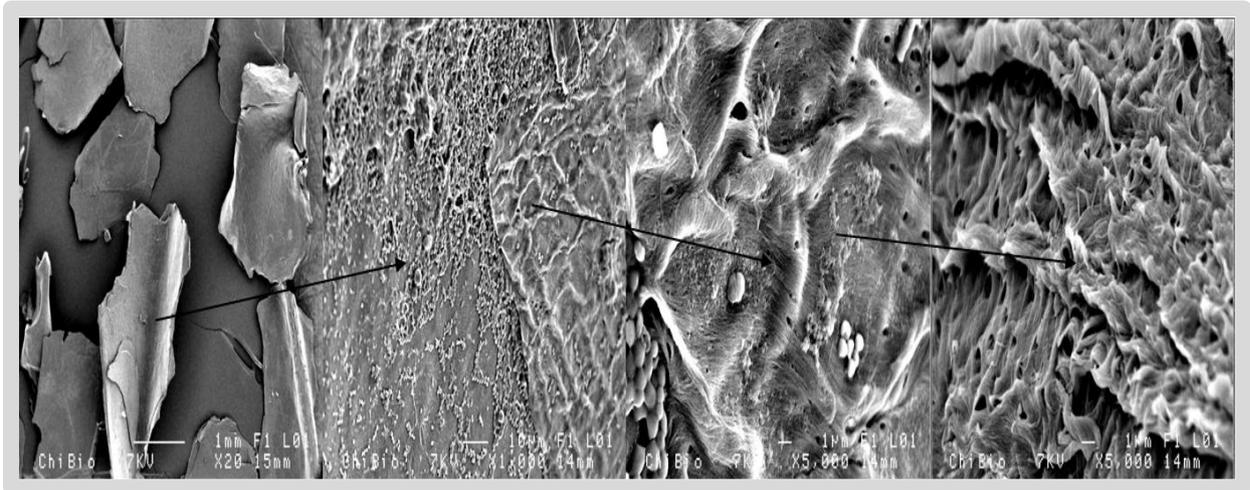


Figure IV.9: Micrographies MEB de la chitine purifiée par voie biologique

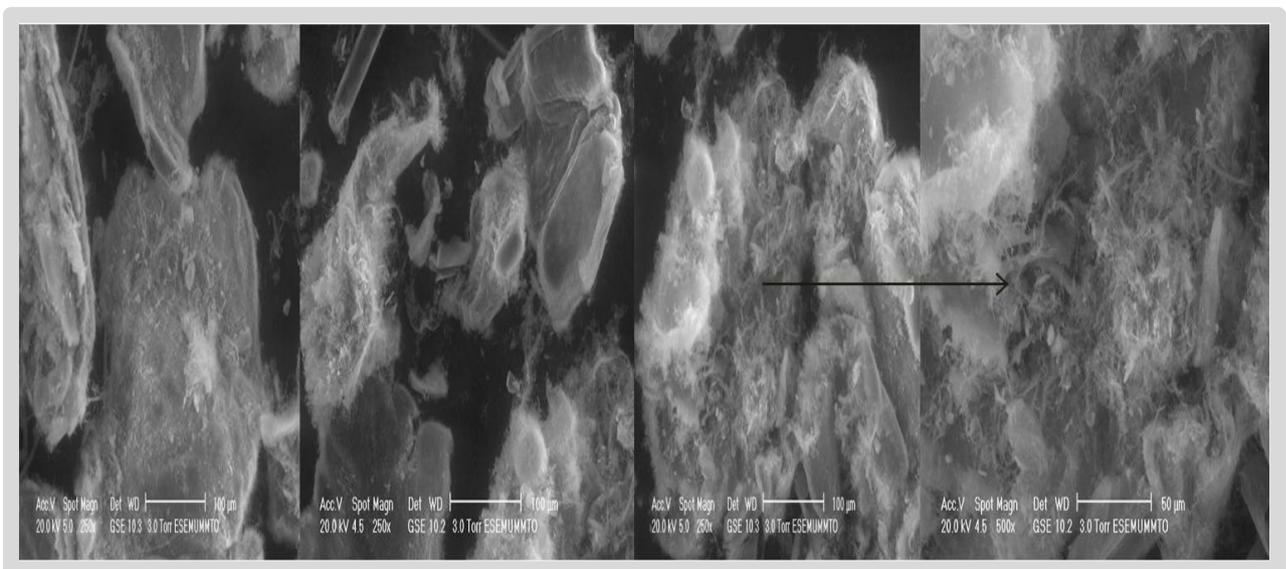


Figure IV.10 : Micrographies MEB de la chitine commerciale (Fluka)

IV.4.3. La morphologie des différentes chitines désacétylées à 23°C et à 30°C

IV.4.3.1. La morphologie des ChitiBio DA

IV.4.3.1.1. Micrographies des ChitiBio DA11,15,21T23

Les photographies des Figures IV.12-14 représentent la morphologie des ChitiBio DAT23, il est constaté que le traitement alcalin a un effet significatif dans la modification de la structure de la chitine DA. En effet, entre 10jours et 21jours de désacétylation, les chitosanes préparés sont semblables au ChitosCom (Fluka) (Figure IV.18).

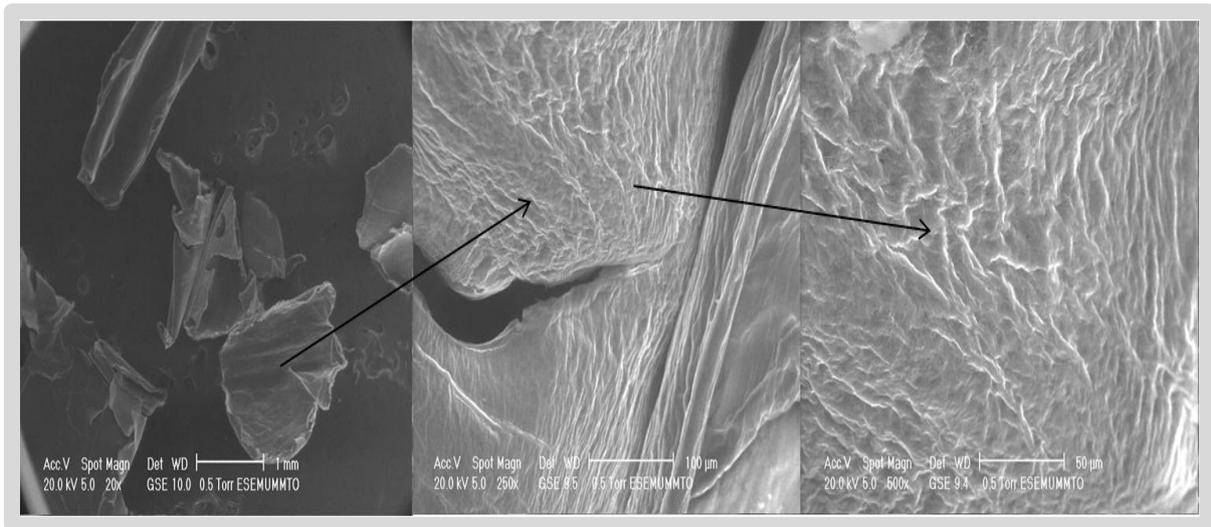


Figure IV.11 : Micrographies MEB de la ChitiBio DA11T23

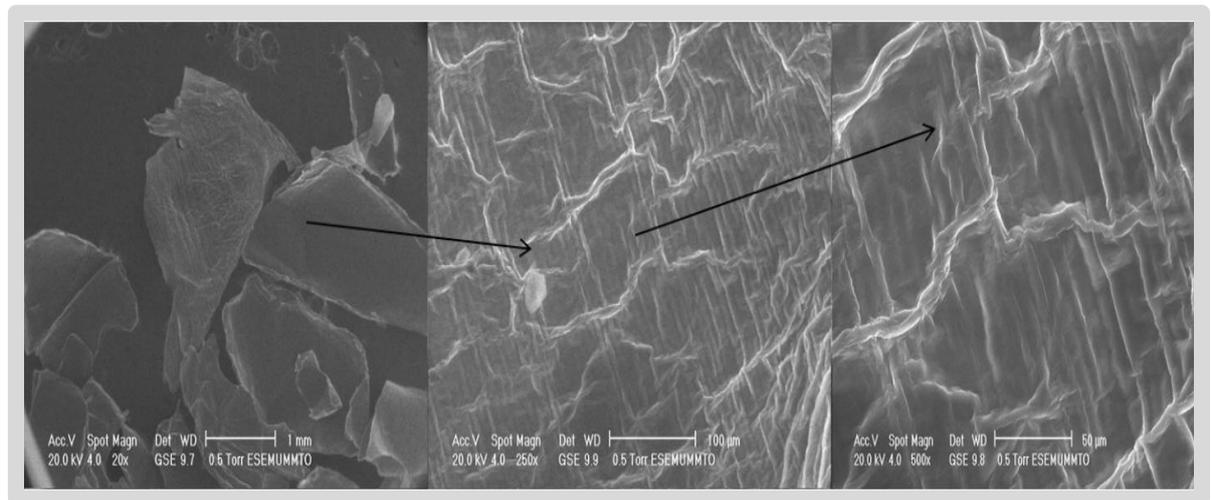


Figure IV.12 : Micrographies MEB de la ChitiBio DA15T23

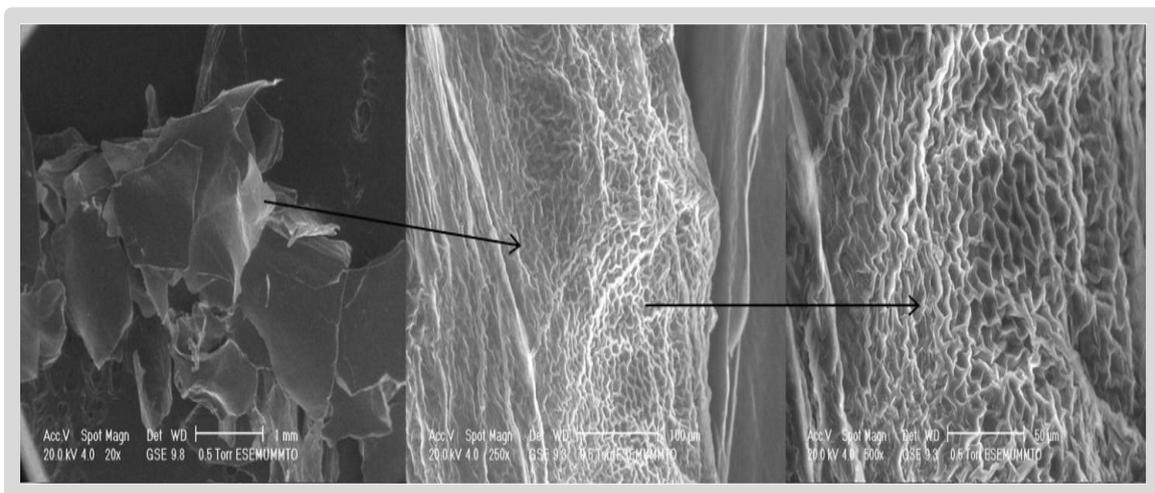


Figure IV.13: Micrographies MEB de la ChitiBio DA21T23

IV.4.3.1.2. Micrographies des ChitiBio DA10,15,20T30

Les photographies des Figures IV.15-17 représentent la morphologie des ChitiBio DAT30. On observe une hétérogénéité de la surface, certains endroits lisses et d'autres poreuses qui ressemble au ChitosCom (Fluka) (Figure IV.18).

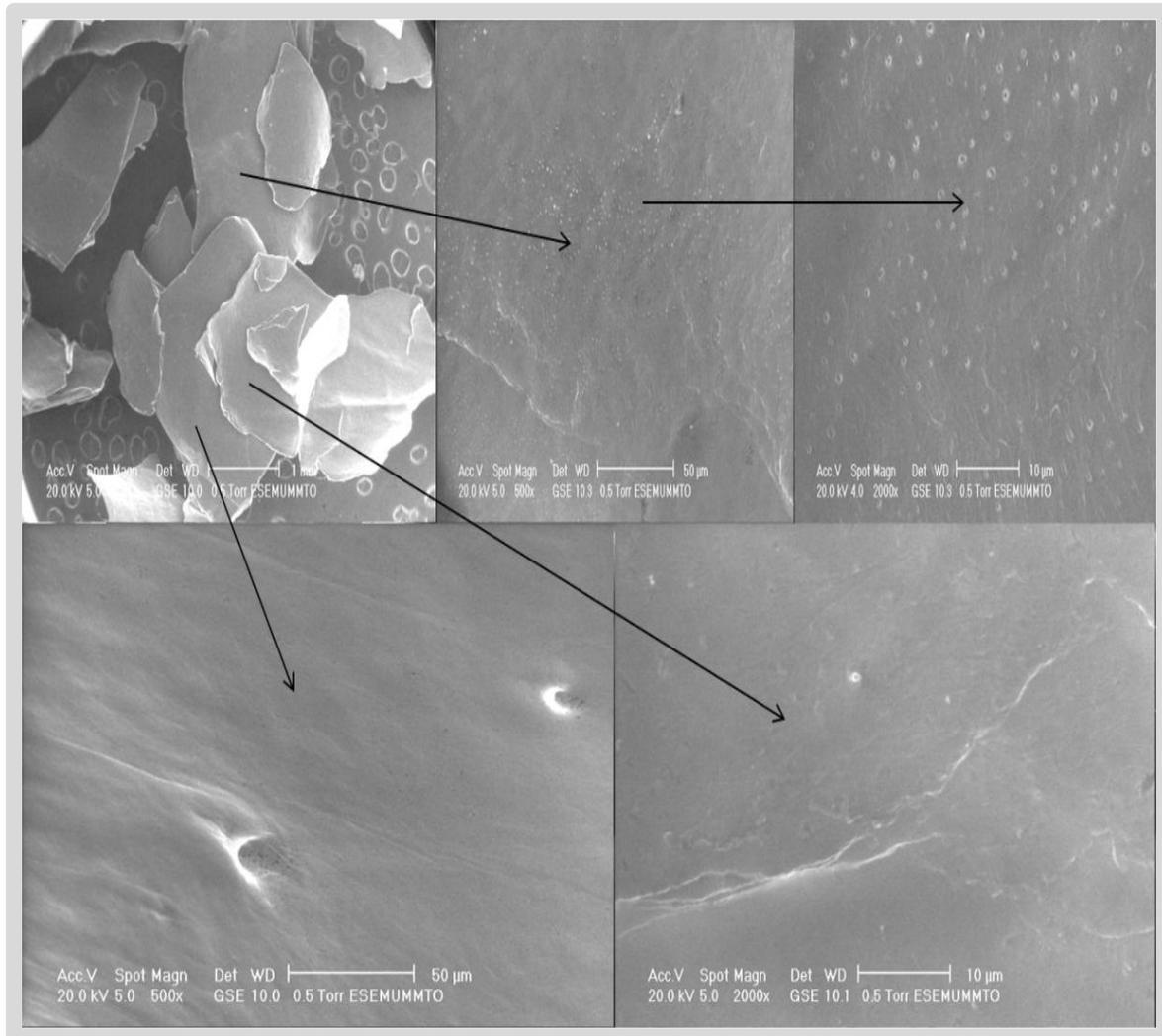


Figure IV.14 : Micrographies MEB de la ChitiBio DA10T30

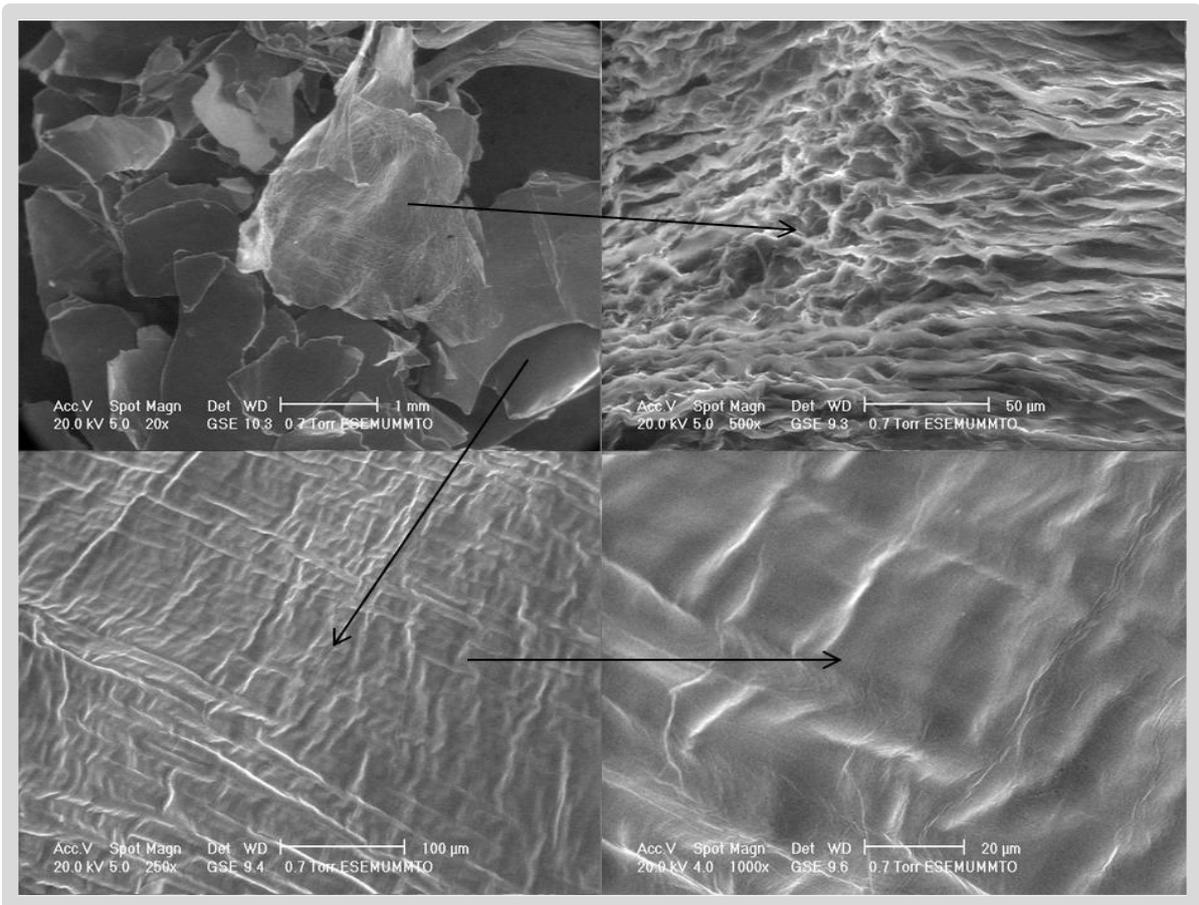


Figure IV.15 : Micrographies MEB de la ChitiBio DA15T30

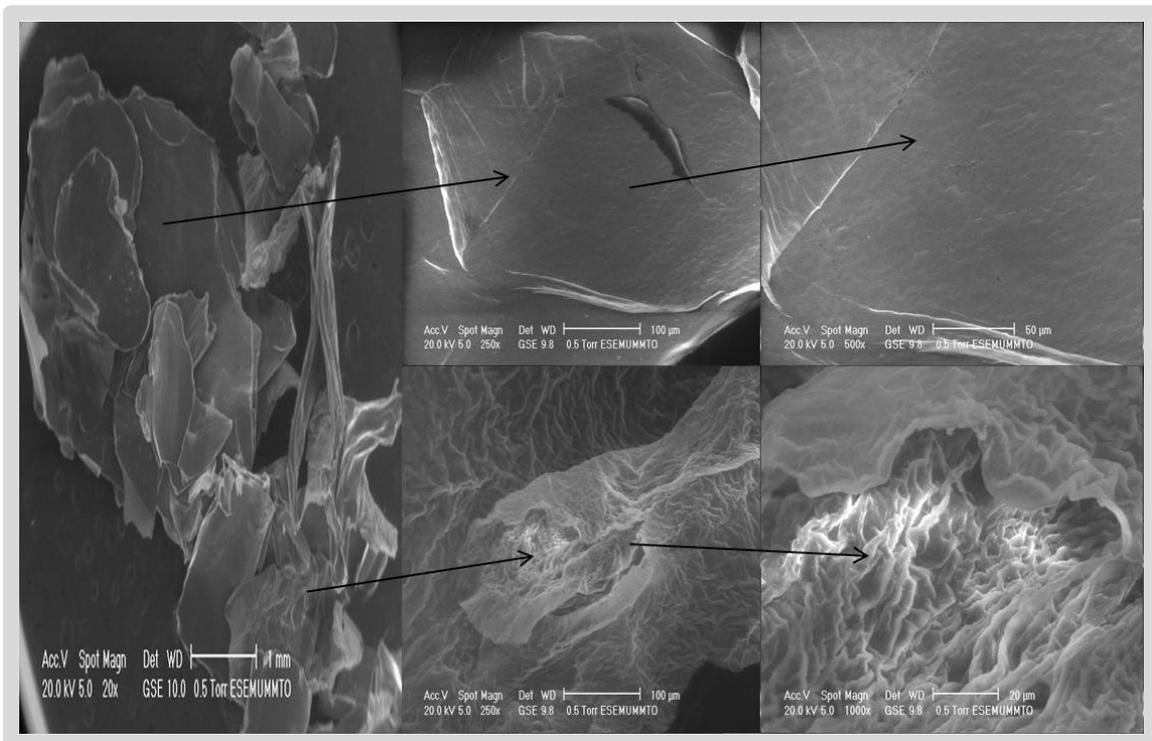


Figure IV.16 : Micrographies MEB de la ChitiBio DA20T30

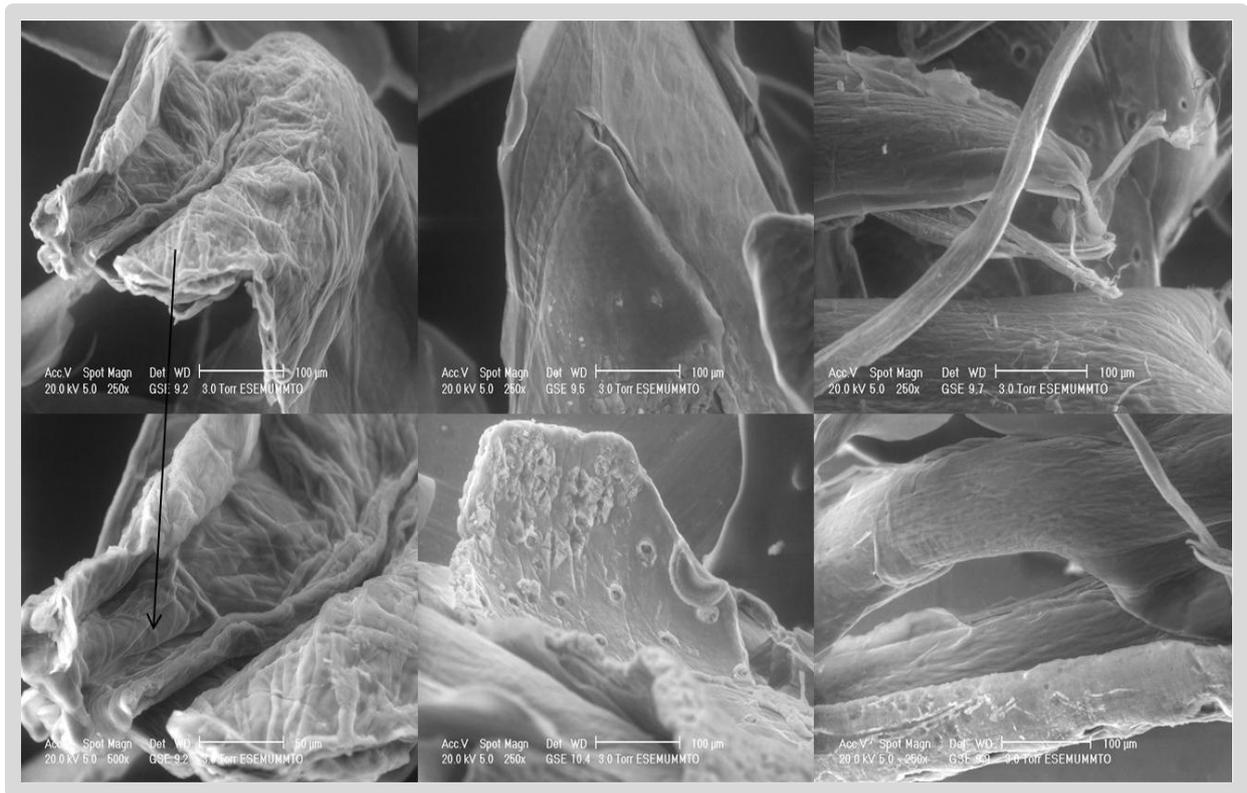


Figure IV.17: Micrographies MEB du chitosane commercial (Fluka)

IV.4.3.2. La morphologie des ChitiChim DA

IV.4.3.2.1. Micrographies MEB des ChitiChim DA11, 15,21T23

Les photographies des Figures IV.19-21 représentent la morphologie des ChitiChim DAT23. On observe une hétérogénéité de la surface, certains endroits lisses et d'autres poreuses qui ressemble au ChitosCom (Fluka) (Figure IV.18).

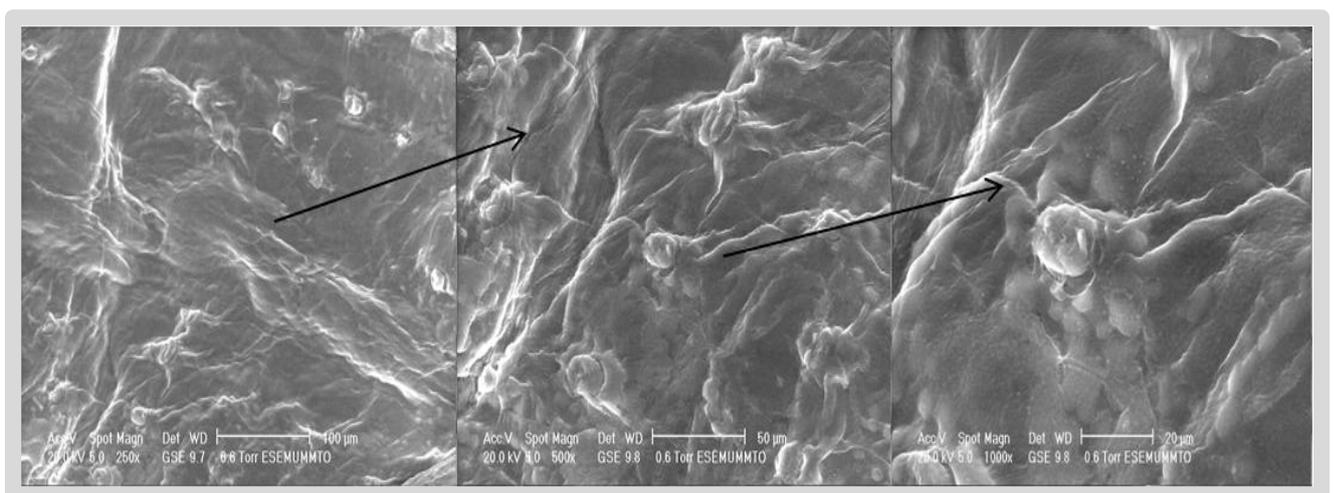


Figure IV.18 : Micrographies MEB de la ChitiChim DA11T23

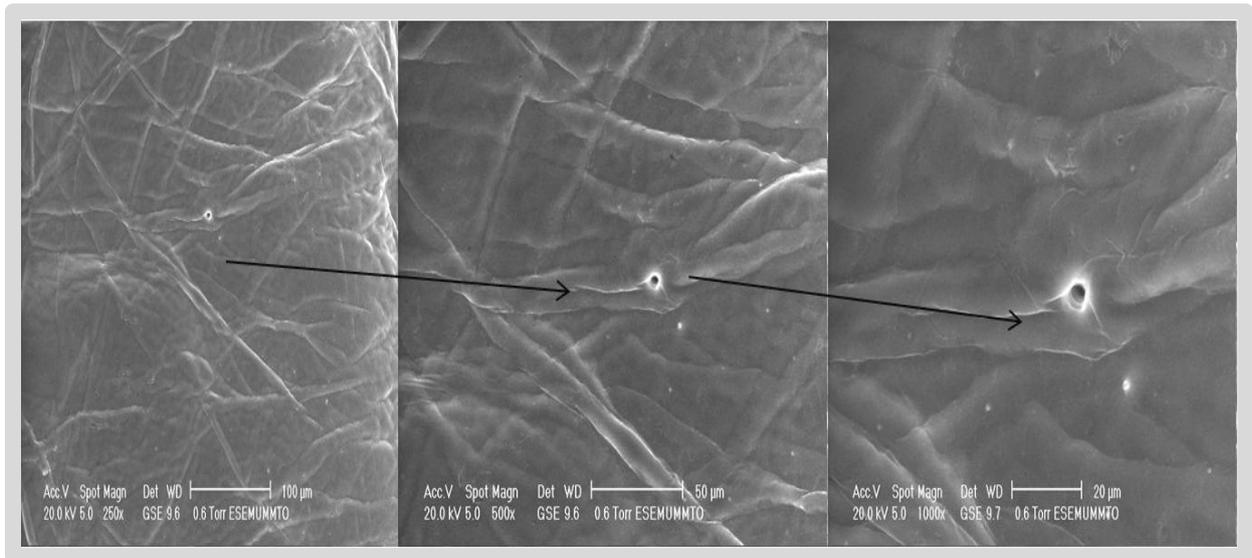


Figure IV.19: Micrographies MEB de la ChitiChim DA15T23

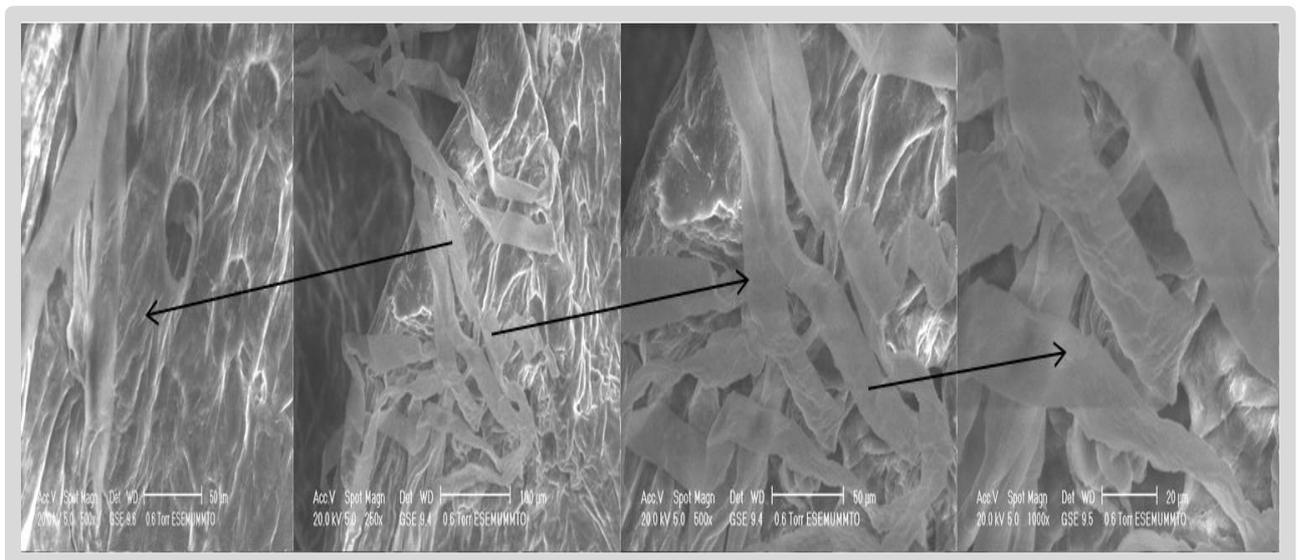


Figure IV.20 : Micrographies MEB de la ChitiChim DA21T23

IV.4.3.2.2. Micrographies des ChitiChim DA10, 15,21T30

Les photographies des Figures IV.22-24 représentent la morphologie des ChitiChim DAT30. On observe une hétérogénéité de la surface, certains endroits lisses et d'autres poreuses qui ressemble au ChitosCom (Fluka) (Figure IV.18).

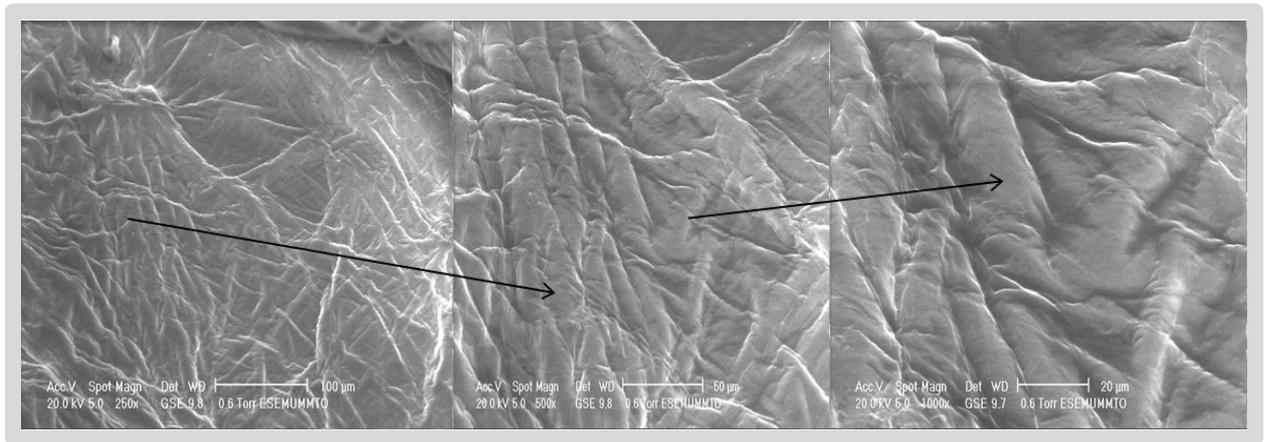


Figure IV.21 : Micrographies MEB de la ChitiChim DA10T30

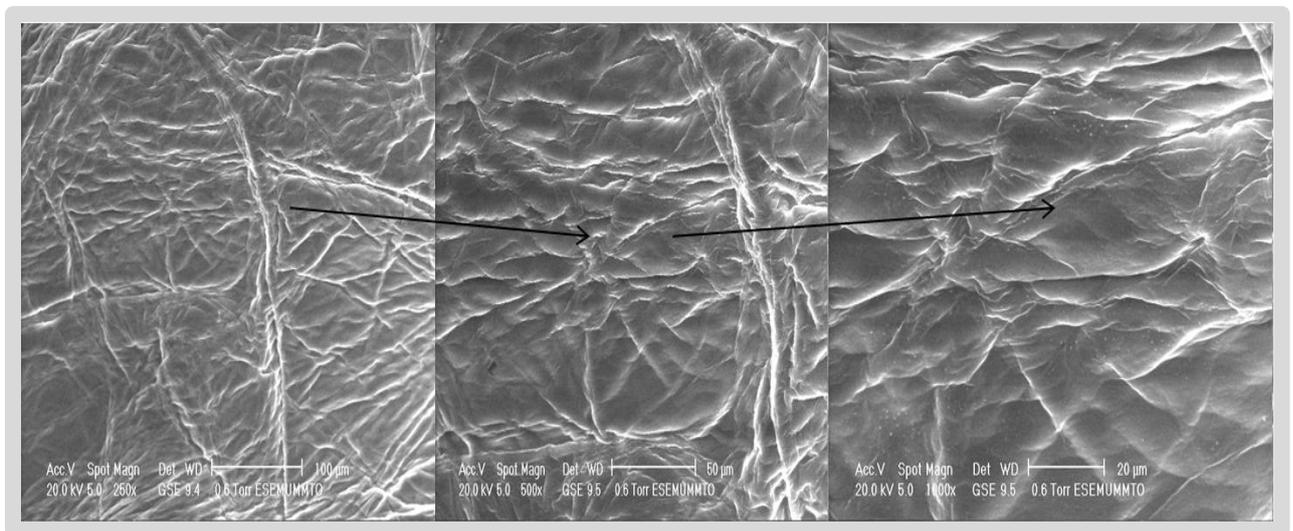


Figure IV.22 : Micrographies MEB de la ChitiChim DA15T30

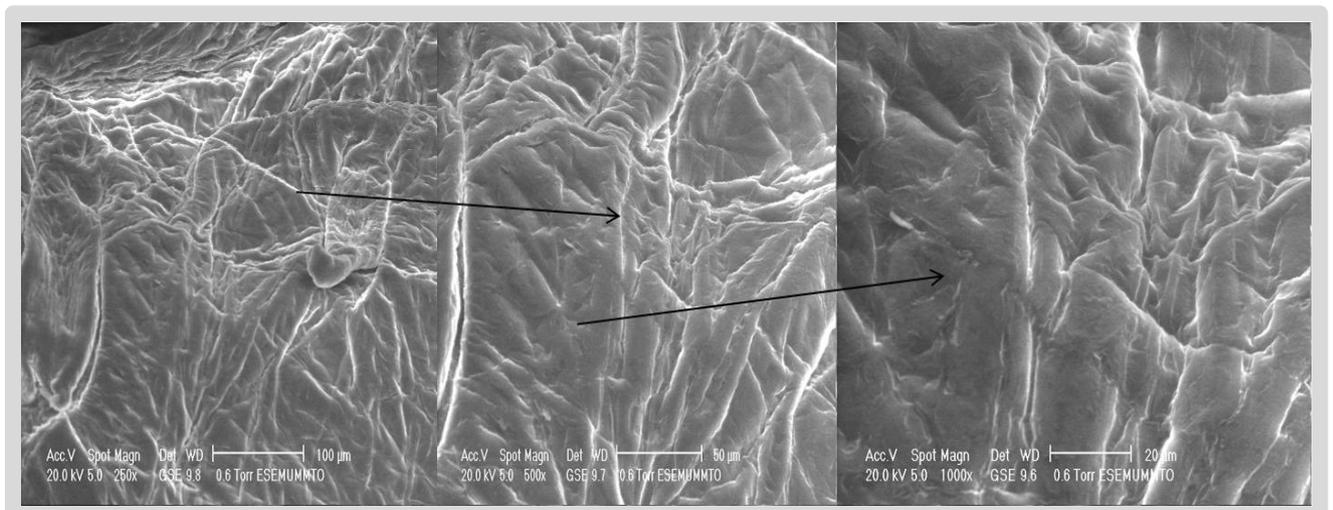


Figure IV.23 : Micrographies MEB de la ChitiChim DA23T30

IV.4.3.3. Les morphologies des ChitiCom DA

IV.4.3.3.1. Micrographie des ChitiCom DA10,15,23T30

Les photographies des figures IV.25-27 représentent la morphologie des ChitiCom DAT30. On observe une hétérogénéité de la surface, certains endroits lisses et d'autres poreuses qui ressemble au ChitosCom (Fluka) (Figure IV.18).

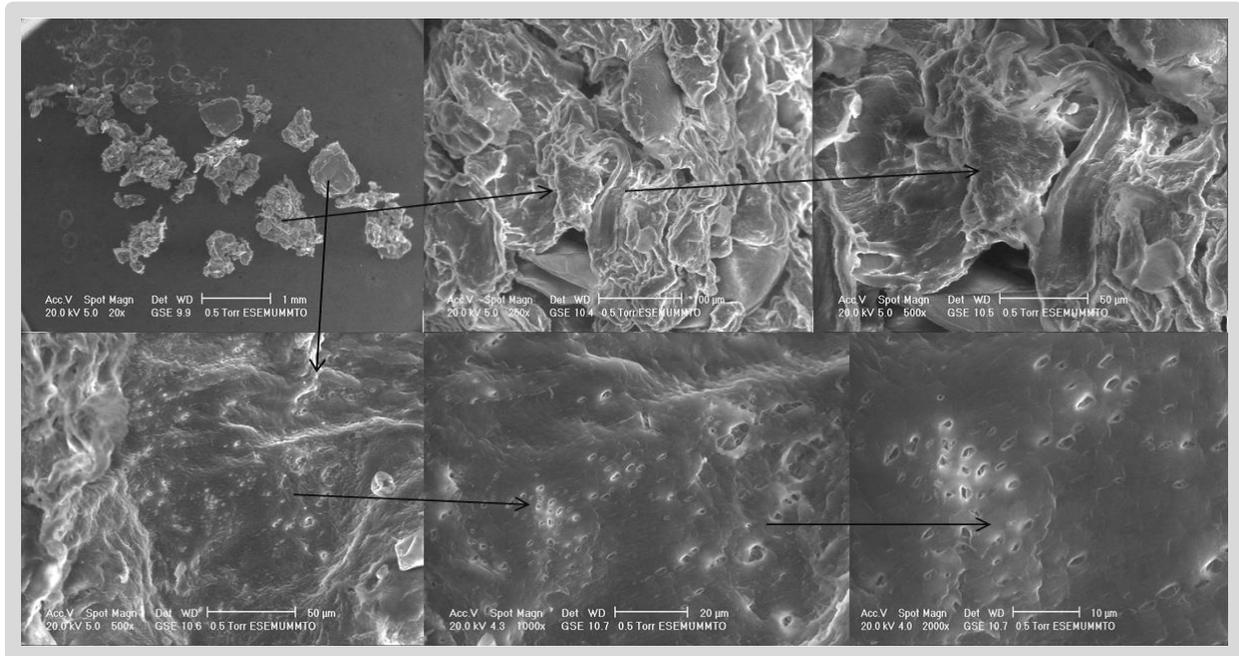


Figure IV.24 : Micrographies MEB de la ChitiCom DA10T30

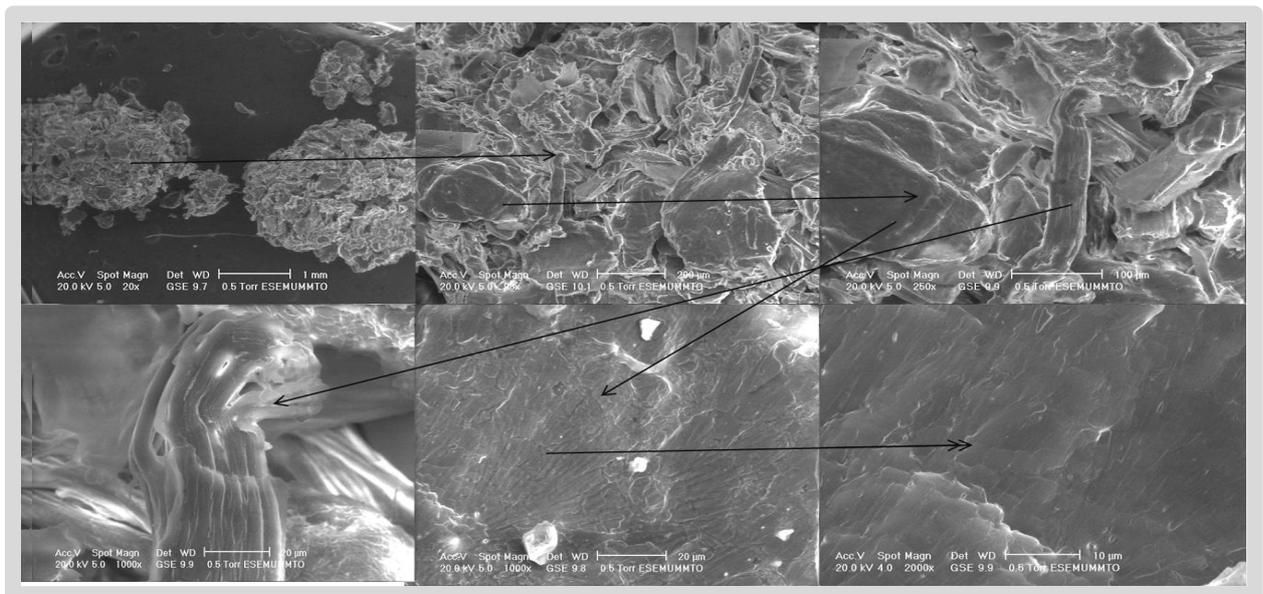


Figure IV.25 : Micrographies MEB de la ChitiCom DA15T30

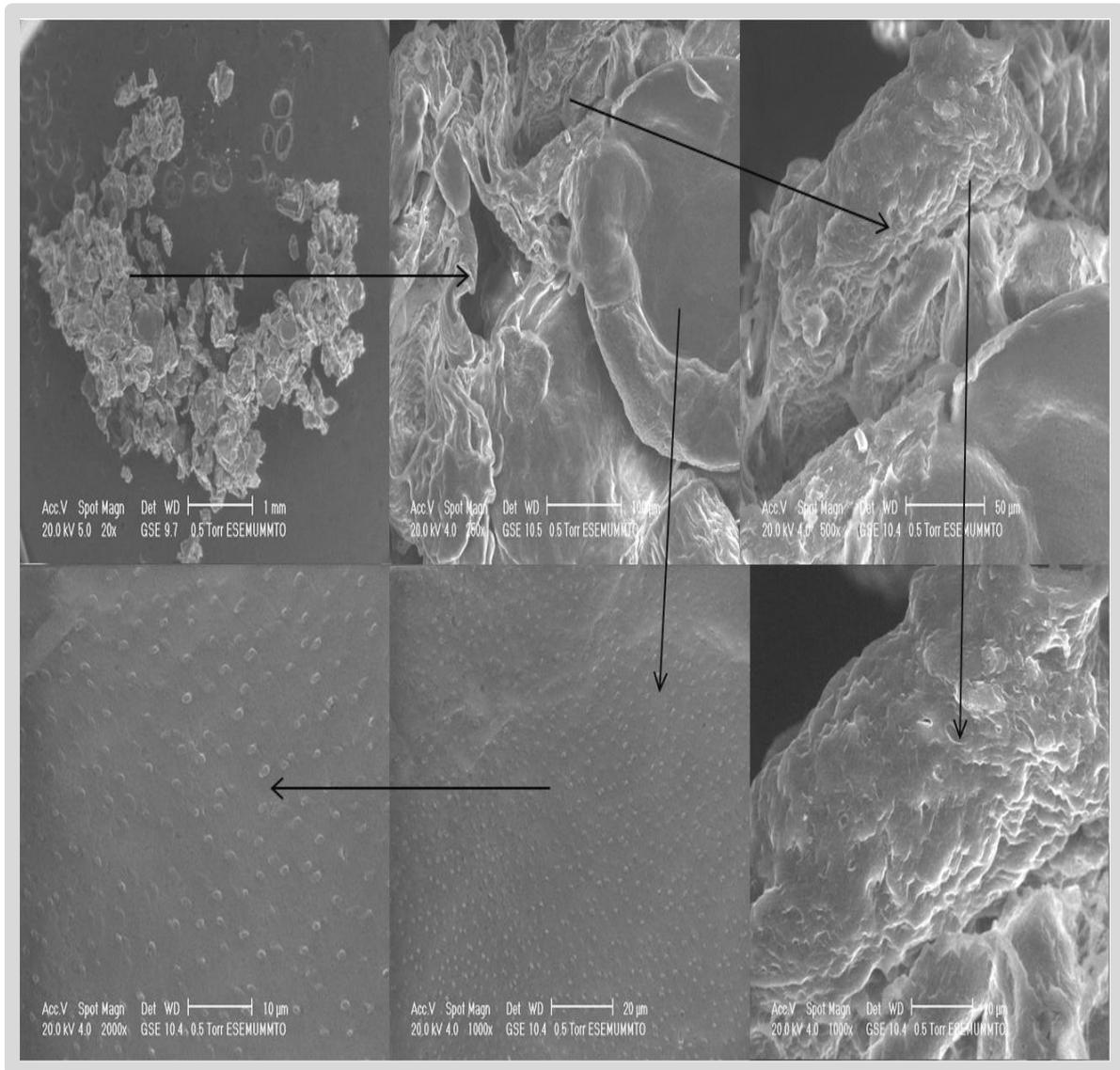


Figure IV.26 : Micrographies MEB de la ChitiCom DA23T30

CONCLUSION GENERALE

Notre travail s'intègre dans la valorisation des co-produits marins (carapaces de crustacés) par la préparation des chitosanes à partir de deux chitines purifiées par deux voies (chimique et biologique) et désacétylées à deux températures différentes 23°C et 30°C avec une faible teneur en NaOH (40%) pendant une durée (t) variable de 10 à 23 jours.

L'étude de la caractérisation a montré que tous les résidus de la désacétylation sont bien solubles dans l'acide acétique à 1% et qu'ils possèdent un degré de désacétylation (DDA), calculé par FTIR, supérieur à 50% puisque ce dernier est compris entre 76% et 82%. Nous pouvons dire que les résidus représentent bien du chitosane et qu'ils diffèrent par le DDA.

Grâce à la propriété de solubilité, dans l'acide dilué, de tous les chitosanes préparés, nous avons pu déterminer le poids moléculaire (PM) par viscosimétrie. Ce dernier varie entre 75 et 750KDa selon le mode d'extraction de la chitine et les conditions de désacétylation, en particulier, la température. Il est constaté que la durée de 10 jours est largement suffisante pour produire des chitosanes ayant des propriétés proches de celle du chitosane commercial (DDA=75% et PM=400KDa). Les poids moléculaires obtenus avec les chitosanes préparés au laboratoire vérifient l'intervalle préconisé par Crini et al. (2009) dans le traitement des eaux (100-500KDa).

Afin de distinguer entre les différents chitosanes préparés, des photographies MEB des chitines désacétylées ont été effectuées. Comparativement aux chitines pures, les micrographies montrent qu'il y a eu modification complète de la surface des Chitines DA après 10 jours de désacétylation en milieu basique. En effet, les fibres observées avant la désacétylation ont disparu pour être remplacées par une structure pleine et lisse, probablement du gel, avec des pores sur quelques régions. Les micrographies des différentes chitines désacétylées à 23°C et à 30°C sont semblables à celles obtenues avec le chitosane commercial (Fluka). L'élévation de la durée semble ne pas avoir d'influence sur la structure de la chitine désacétylée.

Cette étude a montré que la désacétylation de la chitine pouvait être réalisée dans des conditions « douces » qui respectent l'environnement: 40% de base, sans agitation et température proche de l'ambiante. Ces résultats sont très encourageants pour la commercialisation à l'échelle nationale de ce nouveau produit qui est le chitosane

Il sera intéressant de compléter la caractérisation des chitosanes préparés par la détermination de la résonance magnétique nucléaire (RMN) qui va confirmer la disparition

des groupements acétate et envisager des applications de ces biopolymères dans le traitement de dépollution des eaux chargées en matières colloïdales.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Austin, L.G., Bagga, P., Celik, M.** 1981. Breakage properties of some materials in a laboratory ball mill. *Powder Technol.* 28, 235–240.
- Benesch J, Tengvall P.** 2002. Blood protein adsorption onto chitosan, *Biomaterials*, 23, 2561-2568.
- Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F.M., Argüelles-Monal W., Desbrières J.** 2001. Characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions, *Carbohydrate*. 42;3569-3580
- Brugnerotto J., Desbrières J., Roberts G., Rinaudo M.** 2001. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. *Polymer*, 42 (25), 9921-9927.
- Chen R.H., Chang J. R., Shyur J. S.** 1997. Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan. *Carbohyd. Res.* 299, 287-294.
- Chenite A., Buschmann M., Wang D., Chaput C., Kandani N.** 2001. Rheological *Polymers*. 46, 39-47.
- David L., Montembault A., Vizio N., Crépet A.** 2004. Ordering in hydrophobic biopolyelectrolyte chitosan solutions. 5th International Conference on Polymer-Solvent Complexes & Intercalates. 11-13 Juin. Lorient, France.
- Dumay J., Donny-Moreno C., Barnathan G., Jaouen P., Berge J.P.** 2006. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry*. 41, 2327-2332.
- Einbu A., Varum K.M.** 2007. Depolymerization and de-N-acetylation of chitin oligomers in hydrochloric acid. *Biomacromolecules*. 8(1), 309-314.
- Esaiassen M., Myrnes B., Olsen R.L.** 1996. Isolation and substrate specificities of five chitinases from the Hepatopancreas of Northern shrimp, *Pandalus borealis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 113(4), 717-723.
- Fabritius H.O., Sachs C., Triguero P.R., Raabe D.** 2009. Influence of Structural Principles on the Mechanics of a Biological Fiber-Based Composite Material with Hierarchical Organization: The Exoskeleton of the Lobster *Homarus americanus*. *Advanced Materials*. 21(4), 391-400.
- SOFIA.** 2010. The state of world fisheries and aquaculture. In. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 218.

- Felt O.** 1999. Evaluation d'un polysaccharide cationique comme véhicule pour la voie ophtalmique. Thèse de Doctorat, Université de Genève.
- Fox, D.L.** 1973. Chitin-bound keto-carotenoids in a crustacean carapace. *Comp. Biochem. Physio.* 44B, 953.
- GIA.** 2010. CHITINE ET CHITOSAN. Un Rapport De Gestion Stratégique Global. Global Industry Analysts. MCP-2039, 230.
- Gildberg A, Stenberg E.** (2001). A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochem*, 36(8-9), 809-812.
- Crini G, Guibal E, Morcellet M, Torri G et Badot P M., (2009).** Chitine et chitosane. Préparation, propriétés et principales applications. In *Chitine et chitosane du biopolymère à l'application* (pp. 19-54). Besançon: Presses universitaires de Franche-Comté.
- Hur H.K..** 1998. Control of Foam Formation by Antifoam during Demineralization of Crustacean Shell in Preparation of Chitin. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3844-3846.
- Heu M.S., KIM J.S., SHahidi F.** 2003. Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry.* 82, 235-242.
- Heux L., Brugnerotto J., Desbrieres J., Versali M.F., Rinaudo M.** 2000. Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromol*, 1746-751.
- Ibrahim H.M., Salama M.F., EL-Banna H.A.** 1999. Shrimp's waste: chemical composition, nutritional value and utilization. *Nahrung.* 43.
- Jaouen D.** 1994. Chitine, Chitosane et Dérivés. PhD Thèse en pharmacie, Université d'Angers (France).
- Johnson H.M.** 2002. Perspectives de marché dans le secteur international du poisson et des fruits de mer. Autres produits/usages et questions de salubrité alimentaire. Bureau du Commissaire au développement de l'aquaculture.
- Juang R.S., Wu F.C., Tseng R.L.** 2002. Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilization, *Advances in Environmental Research.* 6, 171-177.
- Kadouche S., (2013).** Utilisation des biomatériaux dans le traitement des eaux. Thèse de Doctorat. UMM, T-O.

- Kafetzopoulos D., Martinou A., Bouriotis V.** 1993. Bioconversion of Chitin to Chitosan - Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Mucor rouxii*. Proc Natl Acad Sci U S A. 90(7), 2564-2568.
- Kasaai M. R., Arul J., Chin S. L., Charlet G.** 1999. The use of intense femtosecond laser pulses for the fragmentation of chitosan. J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 120, 201-205.
- Kasaai M.R.** 2007. Calculation of Mark-Houwink–Sakurada (MHS) equation viscosimetric constants for chitosane data. Journal of Carbohydrat Polymers, 68, 477-488.
- Kurita K.** 2001. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin, Prog. Polym. Sci. 26, 1921-1971.
- Kurita K.** 2006. Chitin and chitosane. Functional biopolymers from marine crustaceans. Mar Biotechnol. 8(3), 203-226.
- Maghami G. G., Roberts G. A. F.** 1988. Evaluation of the viscometric constants for chitosan. Die Makromolekulare Chemie. 189(1), 195-200.
- Martinou A., Bouriotis V., Stokke B.T., Varum K.M.** 1998, Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on partially N-acetylated chitosans. Carbohydr Res. 311(1-2), 71-78.
- Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V.** 1995. Chitin Deacetylation by Enzymatic Means - Monitoring of Deacetylation process. Carbohydr Res. 273(2), 235-242.
- Merzendorfer H., Zimoch L.** Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. J. Exp. Biol. 206, 4393-4412.
- Mima S., Miya M., Iwamoto R., Yoshikana S.,** 1983. Highly Deacetylated Chitosan and its Properties. Journal of Applied Polymer Science. 28, 1909-1917.
- Monfort-Windels F.,** 2004. La chitine, matériau de demain. CRIF-WTMC2
- No H. K., Meyers S. P., Lee K. S.** 1989. Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 37(3), 575-579.
- No H.K., Meyers S.P.** 1995. Preparation and characterization of chitin and chitosan (A review). J Aquatic Food Product Technol. 4, 27-52.
- No, H.K., Meyers, S.P.** 1995. Preparation and characterization of chitin and chitosan--a review. J. Aquatic Food Prod. Tech. 4, 27-52.
- Percot A., Viton C., Domard A.** 2003. Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells. Biomacromol. 4, 12-18.

- Peter M.G.** 2002. Chitin and chitosan from animal sources. *Biopolym.* 6, 481-574.
- Ravi Kumar, M.N.V.** 2000. A review of chitin and chitosan applications. *React. Function. Polym.* 46, 1-27.
- Rinaudo M., Pavlov G., Desbrieres J.** 1999. Influenced of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polym.* 40, 7029-7032.
- Rinaudo M.** 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polym.* 42, 3569-3580.
- Rinaudo C.** 1993. Le théâtre Lino Ventura. Évaluation sociale et étude d'impact. Rapport d'étude. Nice: A.R.E.S.
- Roer R., Dillaman R.** 1984. The Structure and Calcification of the Crustacean Cuticle. *American Zoologist.* 24(4), 893-909.
- Seng J.M.** 1988. Chitine, chitosane et dérivés: de nouvelles perspectives pour l'industrie, *Biofutur.* Septembre. 40-44.
- Shahidi F., Synowiecki J.** 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1527-1532.
- Songsiriritthigul C., Pantoom S., Aguda A.H., Robinson R.C., Suginta W.** 2008. Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: Implications for the catalytic mechanism. *J Struct Biol.* 162(3), 491-49.
- Synowiecki J., Al-Khateeb N.A.** 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 145-171.
- Tokura S., Tamura H.** 2007. Chitin and Chitosan. In: *Comprehensive Glycoscience.* Edited by Johannis PK. Oxford: Elsevier. 449-475
- Tsigos I., Bouriotis V.** 1995: Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Colletotrium-Lindemuthianum*. *J Biol Chem.* 270(44), 26286-2629.
- Arbia W., Arbia L., Adour L., Amrane A., Lounici H.** 2013. Optimization of medium composition for enhanced chitin extraction from *Parapenaeus longirostris* by *Lactobacillus helveticus* using response surface methodology. *Food Hydrocolloids.* 31, 392-403.
- Wang S.L., Liang T.W., Yen Y.H.** 2011. Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. *Carbohydr Polym.* 84(2), 732-742.

Yang B. Y., Montgomery R. 2000. Degree of acetylation of heteropolysaccharides. Carbohydr. Res. 323, 156-162.

1. Détermination de la viscosité intrinsèque du ChitosCom et des chitines désacétylées par viscosimétrie

1.1. Du ChitosCom par viscosimètre à bille

- ✓ A partir de la solution étalon de ChitosCom à 0,1 g/dl, préparer dans des fioles jaugées de 50ml, une série de solution aux concentrations suivantes : 0,08 ; 0,06 ; 0,04 et 0,02g/dl.
- ✓ Homogénéiser les solutions préparées.
- ✓ A l'aide d'un viscosimètre à bille, mesurer le temps de chute de la bille de chaque solution (Retourner le tube à jaquette de 180° pour remettre la bille dans sa position de départ et lire 3 à 5 temps de chute puis prendre la moyenne de ces valeurs).
- ✓ Calculer, par la suite, la viscosité dynamique de chaque solution η puis les viscosités réduite η_{red} et inhérente η_{inh} . Les résultats sont rassemblés dans la Figure.1.

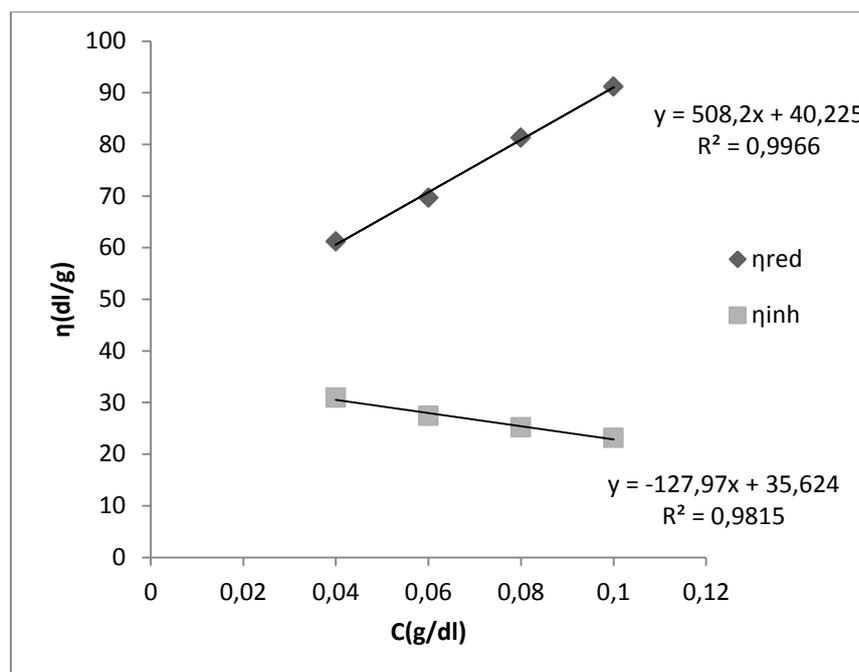


Figure.1: Détermination de la viscosité intrinsèque de ChitosCom (Fluka) par le viscosimètre à bille

1.2. Du ChitosCom par le tube capillaire

- ✓ A partir de la solution étalon du ChitosCom à 1g/dl, préparer dans des fioles jaugées de 50ml, une série de solution aux concentrations suivantes : 0,8 ; 0,6 ; 0,4 et 0,2g/dl.
- ✓ Homogénéiser les solutions préparées.

- ✓ A l'aide d'un tube à vessie, mesurer le temps d'écoulement de chaque solution. Faire au minimum 10 essais puis prendre la moyenne de ces valeurs.
- ✓ Calculer, par la suite, la viscosité dynamique de chaque solution puis η_{red} et η_{inh} (Figure 2).

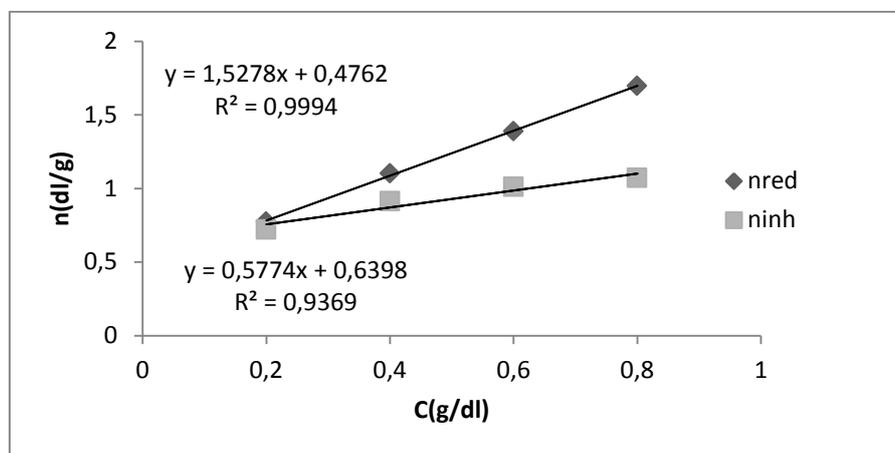
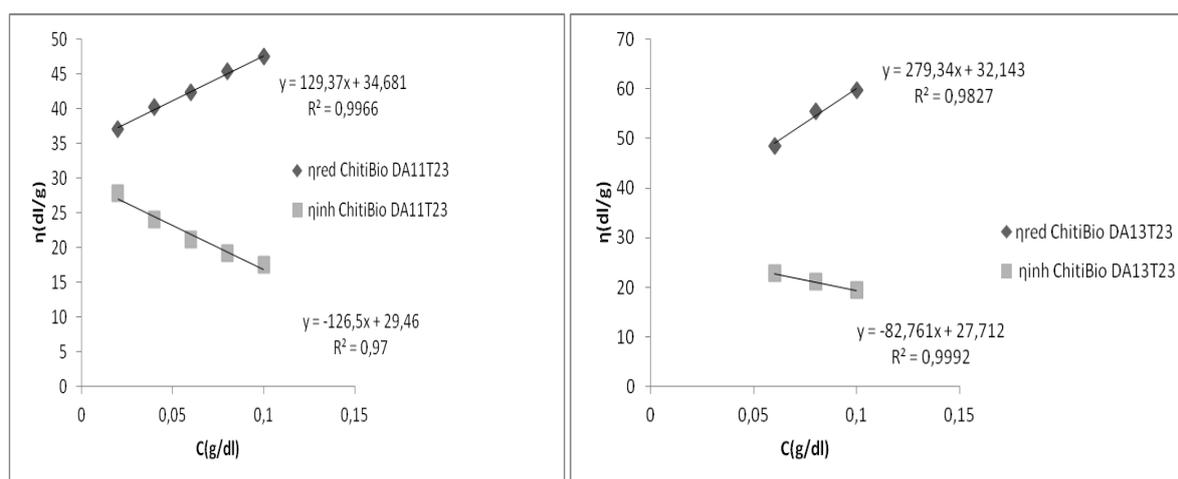


Figure 2: Détermination de la viscosité intrinsèque de ChitosCom (Fluka) par le tube capillaire

1.3. Des chitines désacétylées (par le viscosimètre à bille)

Pour établir les courbes d'étalonnage de la viscosité des chitines désacétylées, nous avons appliqué la même démarche que précédemment.

L'évolution des viscosités η_{red} et η_{inh} en fonction de la concentration de chaque chitine désacétylée est représentée sur les Figures 3-7.



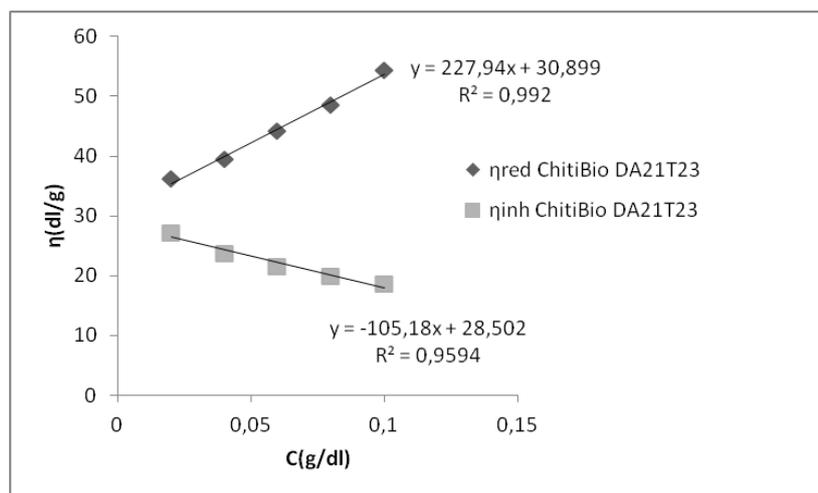


Figure 3: Détermination de la viscosité intrinsèque de ChitiBio DAT23

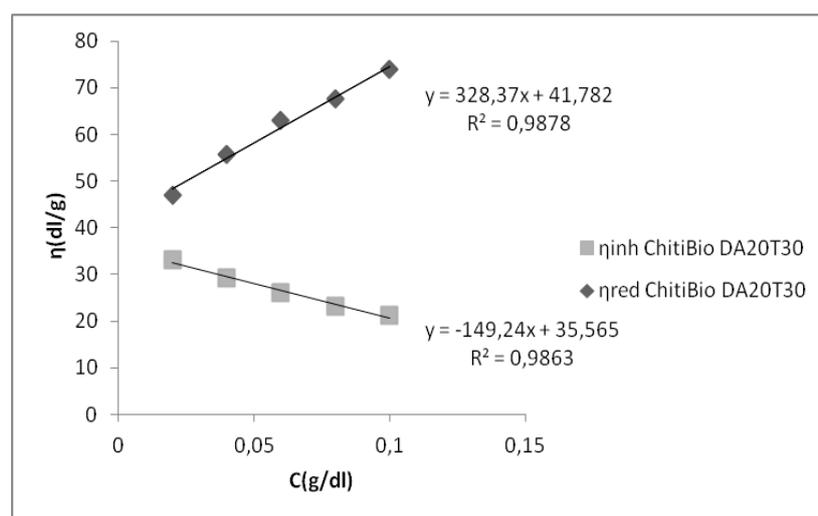
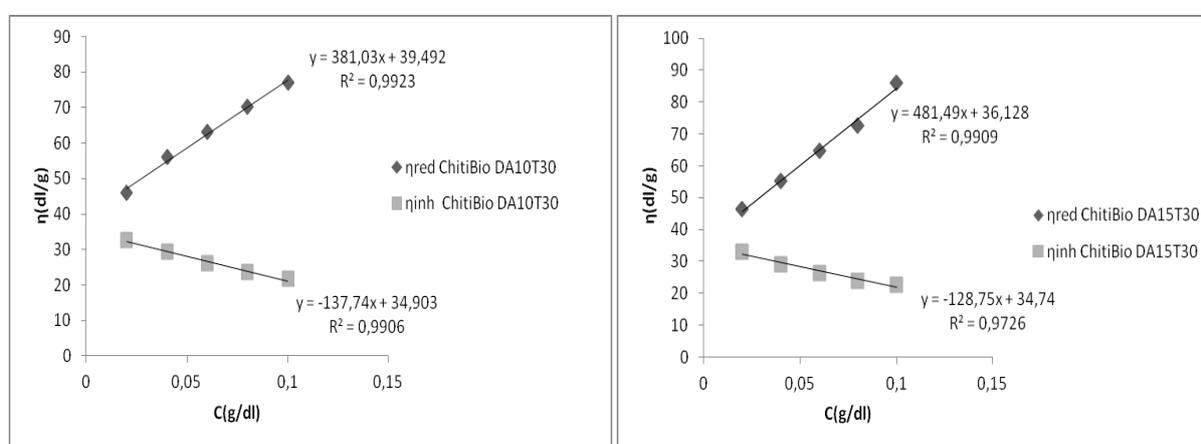


Figure 4: Détermination de la viscosité intrinsèque de ChitiBio DAT30

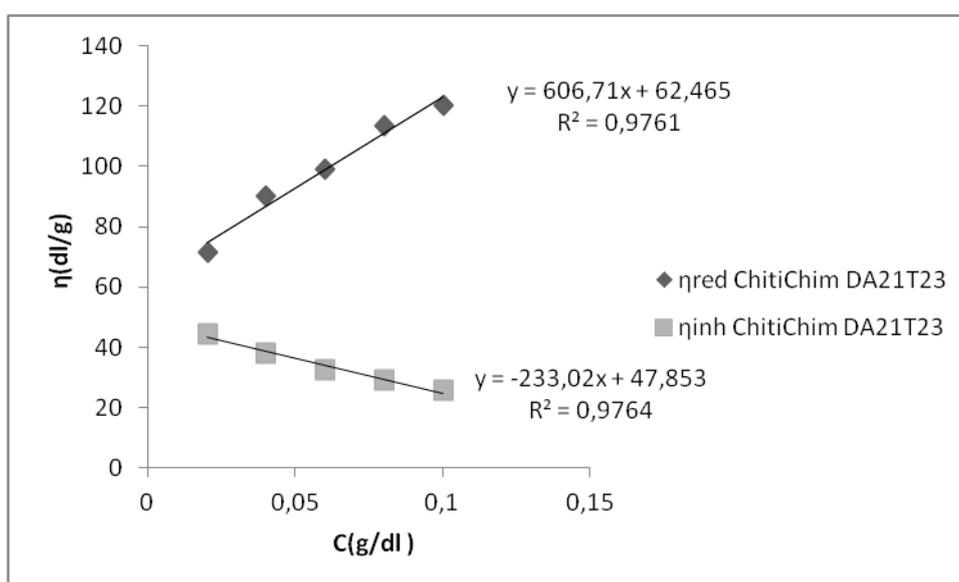
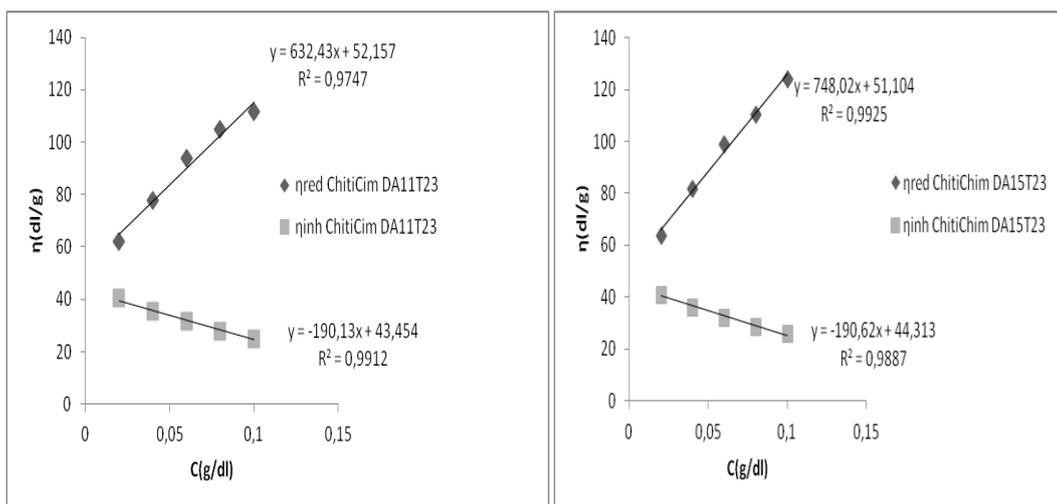
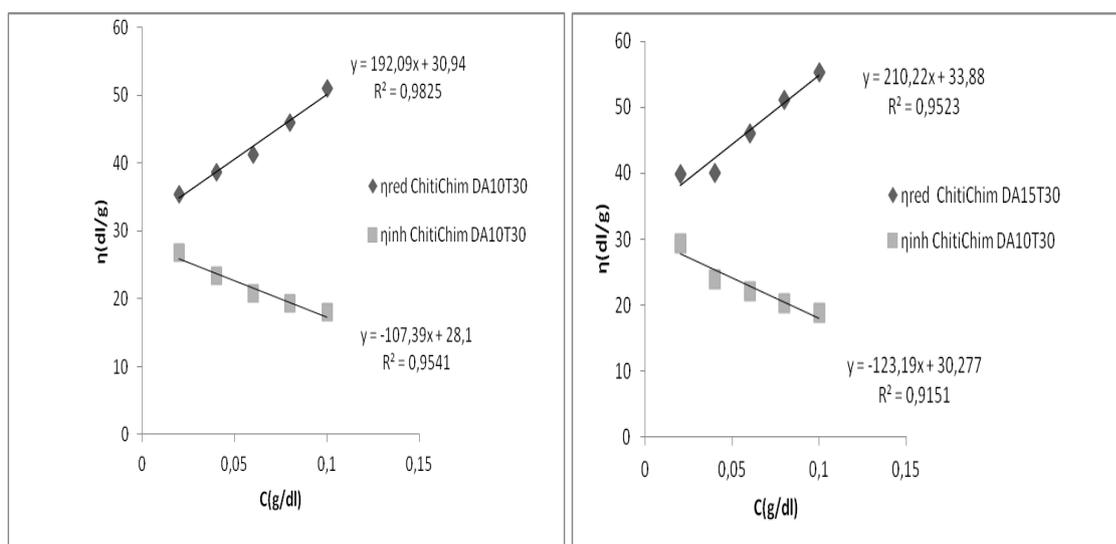


Figure.5: Détermination de la viscosité intrinsèque de ChitiChim DAT23



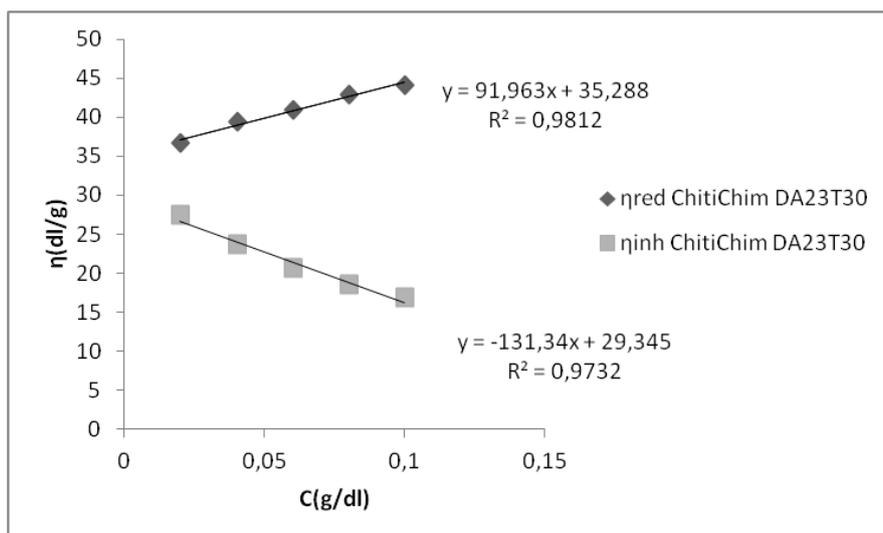


Figure.6: Détermination de la viscosité intrinsèque de ChitiChim DAT30

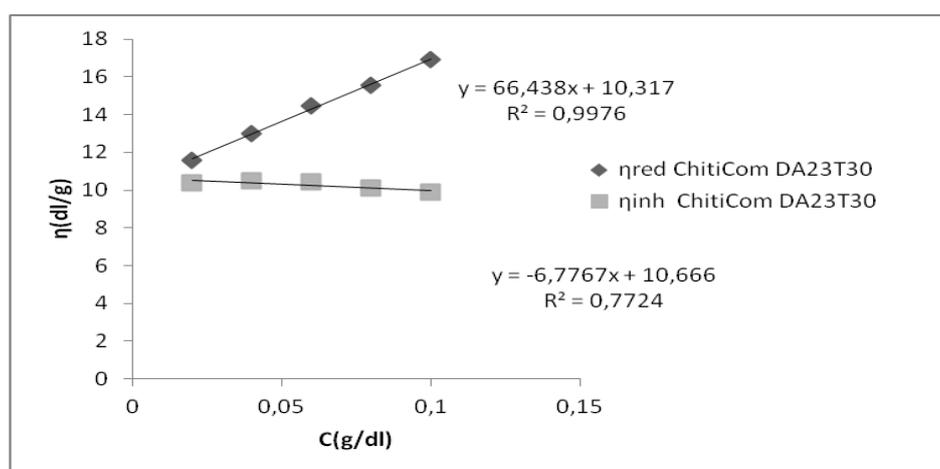
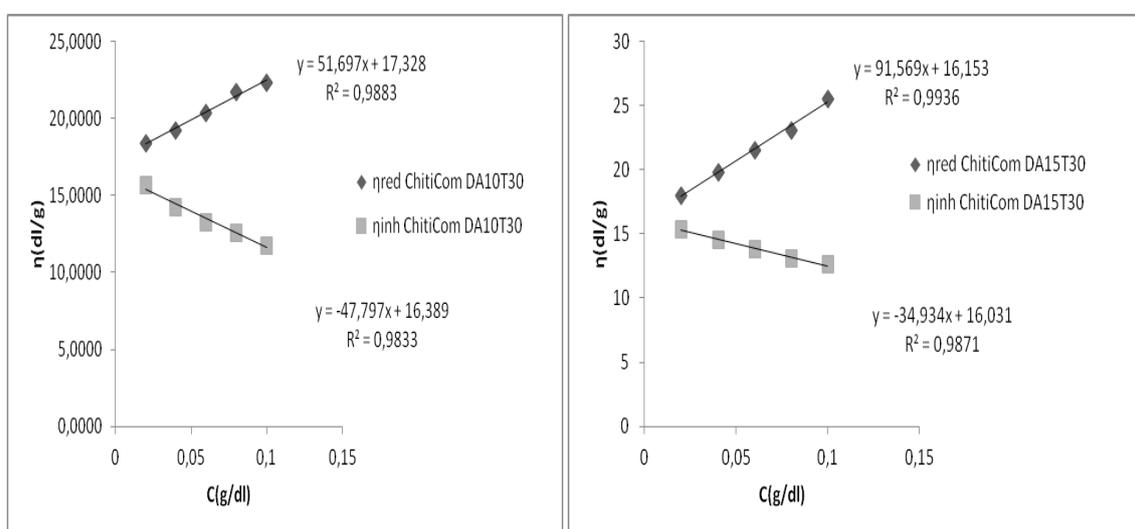


Figure 7: Détermination de la viscosité intrinsèque de ChitiCom DAT30

