REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE YAHI FARES DE MEDEA
FACULTE DE TECHNOLOGIE

Mémoire de fin d'études de Master

Filière : Génie des procédés pharmaceutiques

Spécialité : Génie des procédés pharmaceutiques

Etude comparative des méthodes d'extraction des biomolécules d'intérêt pharmaceutique à partir des déchets des crevettes

---

Présenté par :

BENROUISSI IHAB KAOUTEM
BOUHAFS OUSSAMA

Devant le jury :

Dr. FERGANI Zineb

Dr. BENAISSA Faiza

Dr. MAACHOU Hamida

Promotion 2020-2021

REMERCIMENT

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

Ce document présente l'ensemble des travaux de recherche réalisés durant la préparation du mémoire de master au sein du Laboratoire d'analyse du hall technologique. Nous tenons à remercier Dr. BENAISSA Faiza et Dr. MAACHOU Hamida d'avoir accepter à nous encadrer et nous leurs exprimons nous profonde gratitude et nos très sincère reconnaissance pour leurs apport scientifique remarquable, leurs précieuses directives, leurs grande disponibilité, leurs fructueux conseils et critiques, leurs suggestions pertinentes, leurs suivi constant, leurs courtoisie et leurs qualités humaines.

Nous remercions tout particulièrement Dr. KERMET SAID Hadjira et Dr. FERGANI Zineb d'avoir accepter de participer au jury d'évaluation de ce travail.

A la fin, nous tenons à remercier nos familles, nos mères et nos pères, de nous avoir aidé dans les moments difficiles et de nous avoir motivé à étudier.

DÉDICACE

Du profond de mon cœur, je dédie ce modeste travail :

A ma chère mère qui a sacrifié tout ce qu'elle avait et s'est battue pour nous, moi et mes frères, et qui nous a souri à tout moment malgré les circonstances difficiles. J'espère ma mère que tu es fier de moi.

A mon chère père, Malgré sa maladie, il s'est battu et s'est sacrifié pour nous et nous a donné tout ce qu'il avait... J'espère mon père que tu es fier de moi.

A mon frère Soleiman, Mon frère aîné et le deuxième père. Cher frère Je vous souhaite le meilleur dans votre vie.

A mon frère Abdelrahim, mon compagnon et mon ami. Je vous souhaite de réussir dans vos études et votre vie.

Mon binôme oussama et sa famille.

A mes amis et Mes camarades de promotion Génie des procèdes pharmaceutique

Toutes les personnes qui me connaissent.

Ihab

DÉDICACE

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents qui m'ont guidé durant les moments les plus pénibles de ce long chemin, ma mère Machria qui a été à mes côtés et ma soutenu durant toute ma vie, et mon père Abd El Madjid qui a sacrifié toute sa vie afin de me voir devenir ce que je suis, merci mes parents.

Mes frères: Masoued,Mohamed,Anwer,Haithem Mes sœurs : Hayet,Samiha,Wiam,Hanen

Mon beau-frère : Kamel

Mon binôme ihab et sa famille

A mes adorables amis: Tarek, Abd satter, Amine, Hoccine, Aymen, Abd El malek,Yaccine.

Mes camarades de promotion Génie des procèdes Pharmaceutique

Toutes les personnes qui me connaissent

Oussama

ملخص

تهدف هذه الدراسة بشكل رئيسي إلى استعادة نفايات الروبيان عن طريق استخراج الكايتين والكيتوزان. وقد تم الاستخراج على ثلاث مراحل: إزالة الأملاح المعدنية وإزالة البروتين (درجة الحرارة المحيطة، 40 درجة مئوية و 60 درجة مئوية) وأخيرا عملية نزع الاستيل (140 درجة مئوية) بطريقة التسخين التقليدي (CC) و التسخين بالتحريض الكهرومغناطيسي (CIE). نسبة الرماد التي تم الحصول عليها بعد إزالة المواد المعدنية هي 2.58 %. قيم pH_{pzc} التي تم الحصول عليها هي 8 للعينة (MT3) و 9 للعينة (MT3 ind). وأظهر تحليل نفايات الجمبري بالأشعة تحت الحمراء وجود مجموعات هيدروكسيل والأمينات والاميد والكربونات. وبعد إزالة الأملاح المعدنية، اختفت قمة الكربونات. بعد إزالة الاستيل بواسطة CC، يكون طيف العينة (MT3 amb) متطابق مع العينة (MT2 amb). درجة الحرارة ليس لها أي تأثير على إزالة الأملاح المعدنية. من ناحية أخرى، فإن درجة حرارة 40 درجة مئوية قد عدلت القمم المميزة للأميد. كان لطريقة التسخين (CIE) تأثير على نزع الاستيل من خلال الاختفاء الكامل تقريبا لقمة ≈1632 سم$^{-1}$ مما يدل على محاسن نزع الاستيل ب CIE. أظهرت الدراسة الأولية للامتصاص الحيوي للفوشين الأساسي (FB) وحامض الفوشين (FA) و الجنتيانا البنفسجي (VG) باستخدام عينات (MT1 amb) و (MT3 amb) و (MT3 ind) أن FB و VG لديهما ألفة كيميائية مع العينات (MT1 amb) مع نسب نزع اللون 85٪ و 87٪ على التوالي. من ناحية أخرى، AF لديه ألفة كيميائية مع عينة (MT3 ind) و (MT3 amb) مع نسب نزع اللون من 80٪ و 86٪ على التوالي.

الكلمات المفتاحية: نفايات الجمبري, الكايتين , الكيتوزان , التسخين بالتحريض الكهرومغناطيسي , التسخين التقليدي

Résumé

Cette étude vise principalement la valorisation des déchets de crevettes par extraction de chitine et de chitosane. L'extraction a été effectuée en trois étapes : déminéralisation et déprotéinisation (T ambiante, 40 °C et 60 °C) et enfin désacétylation (140 °C) par chauffage classique (CC) et par chauffage à induction électromagnétique (CIE). Le taux de cendre obtenu après déminéralisation est de 2.58 %. Les valeurs de pH_{pzc} obtenus sont de l'ordre de 8 pour l'échantillon (MT3) et 9 pour l'échantillon (MT3 ind). L'analyse par FTIR des déchets de crevettes a montré la présence des groupements hydroxyles, amines, amides et carbonates. Après déminéralisation, le pic des carbonates a disparu. Après désacétylation par CC, le spectre de l'échantillon (MT3 amb) est superposable à celui de l'échantillon (MT2 amb). La température n'a pas d'effet sur la déminéralisation. Par contre, une température de 40 °C a modifié les pics caractéristiques des amides. Le mode de chauffage (CIE) avait une influence sur la désacétylation par disparition quasi-totale du pic ≈1632 cm-1 ce qui montre l'avantage de la désacétylation par CIE. L'étude préliminaire de biosorption de fuchsine basique (FB), fuchsine acide (FA) et violet de gentiane (VG) en utilisant les échantillons (MT1 amb), (MT3 amb) et (MT3 ind) a montré que la FB et le VG ont une affinité aux échantillons (MT1 amb) avec des taux de décoloration de 85 % et 87 % respectivement. Par contre, la FA à une affinité aux échantillons (MT3 ind) et (MT3 amb) avec des taux de décoloration de 80 % et 86 % respectivement.

Mots clés : Déchets de crevettes, Chitine, Chitosane, Chauffage par induction électromagnétique, Chauffage classique

Abstract

This study mainly aims to the recovery of shrimp waste by extraction of chitin and chitosan. The extraction was carried out in three stages: demineralization and deproteinization (ambient T, 40 °C and 60 °C) and finally desacetylation (140 °C) by conventional heating (CC) and by electromagnetic induction heating (CIE). The ash rate obtained after demineralization is 2.58%. The pH_{pzc} values obtained are in the order of 8 for the (MT3) sample and 9 for the (MT3 ind) sample. FTIR analysis of shrimp waste showed the presence of hydroxyl groups, amines, amides and carbonates. After demineralization, the peak of carbonates disappeared. After desacetylation by CC, the spectrum of the sample (MT3 amb) is the same as the spectrum of the (MT2 amb) sample. Temperature has no effect on demineralization. On the other hand, a temperature of 40 °C has modified the peaks characteristic of amides. The mode of heating (CIE) had an influence on the desacetylation by almost total disappearance of ≈1632 cm-1 peak which shows the advantage of desacetylation by CIE. The preliminary biosorption study of basic fuchsin (FB), acid fuchsin (FA) and gentian violet (VG) using samples (MT1 amb), (MT3 amb) and (MT3 ind) showed that FB and VG have an affinity to the (MT1 amb) sample with discoloration rates of 85% and 87% respectively. On the other hand, AF has an affinity to the samples (MT3 ind) and (MT3 amb) with discoloration rates of 80% and 86% respectively.

Keywords: Shrimp waste, Chitin, Chitosan, Elecromagnetic induction heating, Conventional heating.

Liste des Abréviations

$CaBr_2$: bromure de calcium

$CaCl_2$: chlorure de calcium

$Ca(CNS)_2$: sulfo-cyanonitul de calcium

$CaCO_3$: carbonate de calcium

CaI_2 : iodure de calcium

CH_2Cl_2 : dichlorométhane ou chlorure de méthylène

CH_2O_2 ou HCOOH : acide méthanoïque

DCA : acide dichloroacetique

DMAc : N,N-diméthylacétamide

DMF : diméthylformamide

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

GlcN : Glucosamin

GlcNAc: Acéthyl-glucosamine

HCl : acide chlorhydrique

GPC : Chromatographie sur gel perméable

H_2SO_4 : acide sulfurique

H_3PO_4 : acide phosphorique

IR: Infra Rouge

LiCI : chlorure de lithium

LiCNS : sulfo-cyanonitul de lithium

MeOH : méthanol

N_2O_4 : peroxyde d'azote, ou tétraoxyde de diazote

NaClO : Hypochlorite de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium

NMP : N-méthylpyrrolidone

RMN : résonance magnétique nucléaire

Liste des figures

Figure (I.1):grandes familles des biopolymères.....4

Figure (I.2):structure moléculaires de la chitine 6

Figure (I.3):sources potentielles de la chitine.....9

Figure (I.4):structures chimique du chitosane 12

Figure (II.1): procédés d'extraction de la chitine et chitosane 20

Figure (II.2): Désacétylation enzymatique de la chitine 21

Figure (II.3): Microscope électronique à balayage.....22

Figure (II.4): Diffractomètre des rayons X (DRX) (bunker, phaseur modèle D2, Allemagne).....22

Figure (II.5):schéma du principe de spectroscopie FTIR.....23

Figure (II.6):spectre RMN 1H du chitosane (à faible masse).....23

Figure (II.6):spectre RMN 1H du chitosane (à faible masse).....25

Figure (III.1): Etapes d'obtention de chitine et du chitosane.....28

Figure (III.2): Opérations de prétraitement des déchets des crevettes.....29

Figure (III.3): Tamis vibreur utilisé pour l'analyse granulométrique.....30

Figure (III.4): Opération de déminéralisation 31

Figure (III.5): Opération de déprotéinisation 32

Figure (III.6): Montage utilisé pour la désacétylation par chauffage classique 33

Figure (III.7): Montage utilisé pour la désacétylation par chauffage à induction électromagnétique.....34

Figure (III.8): Four à moufle utilisé pour la calcination 36

Figure (III.9): Opération de test de gonflement.....36

Figure (III.10): Spectrophotomètre FTIR utilisé 38

Figure (III.11): Poudre des déchets des crevettes.....39

Figure (III.12): Granulométrie de la poudre des déchets des crevettes 39

Figure (III.13): Poudre déminéralisé(MT1) 40

Figure (III.14): Lien covalent probable dans le complexe chitine-protéine..... 41

Figure (III.15): Poudre déprotéinisée(MT2) 41

Figure (III.16): Poudre désacétylé de MT3 amb (a) et MT3 ind (b) 41

Figure (III.17): Présentation schématique de la désacétylation..... 42

Figure (III.18): Perte de poids après déminéralisation..... 43

Figure (III.19): Perte de poids après déprotéinisation 43

Figure (III.20): Perte de poids après désacétylation 44

Figure (III.21): Rendement en chitosane 44

Figure (III.22): Taux de cendre des échantillons après calcination..... 45

Figure (III.23): Taux de gonflement de (MT3 amb) et (MT3 ind)..... 46

Figure (III.24): Solubilité des échantillons (MT3) obtenus par les différentes méthodes . 46

Figure (III.25):évolution du pH en fonction du volume de HCl (à gauche de l'axe des pH) et NaOH (à droite de l'axe des pH) pour l'échantillon (MT3 ind)..... 47

Figure (III.26):évolution du pH en fonction du volume de HCl (à gauche de l'axe des pH) et NaOH (à droite de l'axe des pH) pour l'échantillon (MT3 amb) 47

Figure (III.27):spectres FTIR des échantillons : MNT (a), MT1 amb (b) et MT2 amb (c)..... 48

Figure (III.28):spectres FTIR de MT2 amb (a) et MT3 amb (b)..... 49

Figure (III.29):spectres FTIR de MT1.60 (a), MT1.40 (b) et MT1 amb (c) 49

Figure (III.30):spectres FTIR de MT2 amb (a), MT2.40 (b) et MT2.60 (c) 50

Figure (III.31):spectres FTIR de MT3 amb (a) et MT3.40 (b) et MT3.60 (c) 50

Figure (III.32):spectres FTIR de MT3 ind (a) et MT3 amb (b)..... 51

Figure (III.33):spectrophotomètre SHIMADZU, UV mini-1240..... 54

Figure (III.34):courbe d'étalonnage du violet de gentiane..... 55

Figure (III.35):courbe d'étalonnage de fuchsine basique 55

Figure (III.36):courbe d'étalonnage de fuchsine acide 56

Figure (III.37): Cinétique de biosorption des colorants sur l'échantillon (MT1 amb) 57

Figure (III.38): Cinétique de biosorption des colorants sur l'échantillon (MT3 ind).....57

Figure (III.39): Cinétique de biosorption des colorants sur l'échantillon (MT3 amb).....58

Liste des tableaux

Tableau(I.1): propriétés spécifiques de quelque biopolymères et les applications attendues 5

Tableau(I.2): solvants répertoriés pour la chitine 8

Tableau(I.3): sources potentiel de chitine..... 10

Tableau(I.4): composition des carapaces de quelques crustacés 11

Tableau(I.5): propriétés du chitosane..... 13

Tableau(I.6): Différentes applications du chitosane 16

Tableau(II.1): Nombres d'ondes et groupe chimique des bandes d'absorption FTIR pour le chitosane..... 24

Tableau(III.1): Appareillage utilisé 26

Tableau(III.2): produits utilisés dans la partie expérimentale..... 27

Tableau(III.3): conditions opératoires de la déminéralisation..... 31

Tableau(III.4): Conditions opératoires de la déprotéinisation..... 32

Tableau(III.5): conditions opératoires de l'étape de désacétylation..... 34

Tableau(III.6): attribution des pics d'absorption des échantillons désacétylé 52

Tableau(III.7): Caractéristiques physico-chimiques de fuchsine basique, fuchsine acide et violet gentiane 53

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste des abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Introduction générale..... 1

Chapitre I :

Biopolymères : Chitine et chitosane

I.1.Généralités sur les biopolymères..... 3

I.1.1.Définition 3

I.1.2.Différentes familles des biopolymères..... 4

A.Biopolymères d'origine biologique..... 4

B. biopolymères synthétique..... 4

I.1.3.Propriétés des biopolymères et leurs applications 5

I.2.Chitine..... 5

I.2.1.Historique 5

I.2.1.Définition et structure de la chitine..... 6

I.2.2.1.Structure chimique de la chitine 6

I.2.2.2.Structure cristalline de la chitine 7

I.2.3.Propriétés physico-chimiques de la chitine..... 7

I.2.4.les sources de la chitine..... 9

I.3.Chitosane..... 11

I.3.1.Historique 11

I.3.2.Définition et structure chimique 11

I.3.3.Sources de chitosane..... 12

I.3.4.Propriétés du chitosane 12
I.3.4.1.Propriétés physico-chimiques 13
I.3.4.2.Propriétés biologiques 14
I.4.Applications 15
I.4.1.Purification de l'eau usée 15
I.4.2.Agriculture 15
I.4.3.Médical 15
I.4.4.Domaine cosmétique 16

Chapitre II :

Extraction et caractérisation instrumentale de chitine et du chitosane

II.1.Extraction par voie chimique 18
II.1.1.Déminéralisation 18
II.1.2.Déprotéinisation 18
II.1.3.Décoloration 19
II.1.4.Désacétylation 19
II.2.Extraction par voie enzymatique 20
II.2.1.voie fermentaire 20
II.2.2.Déprotéinisation et déminéralisation enzaymatiques 21
II.2.3.Désacétylation et dépolymérisation enzymatique 21
II.3.Méthodes instrumentales pour la caractérisation de la chitine et du chitosane 21
II.3.1.Microscope électronique à balayage (MEB) 21
II.3.2.Diffraction des rayons X (DRX) 22
II.3.3.Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) 23
II.3.4.Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) 24

Chapitre III :

Partie expérimentale

III.1.Introduction 26

III.2.Matériels et Produits 26
III.2.I. Matériels 26
III.2.2.Produits chimique 27
III.2.3.Matériel biologique 27
III.3.Extraction des biomacromolécules 27
III.3.1.Modes opératoires 29
III.3.1.1.Prétraitement des déchets des crevettes 29
III.3.1.2.Analyse granulométrique de la poudre obtenue 30
III.3.1.3.Déminéralisation 30
III.3.1.4.Déprotéinisation 32
III.3.1.5.Désacétylation 33
III.3.1.6.Perte en poids 34
III.3.1.7.Rendement de l'extraction 35
III.3.1.8.Taux de cendres 35
III.3.1.9.Test de gonflement 36
III.3.1.10.Test de solubilité 37
III.3.1.11.Détermination du pH zéro charge 37
III.3.1.12.Analyse par spectroscopie infra-rouge 38
III.3.2.Résultats et Discussions 39
III.3.2.1.Résultat du prétraitement 39
III.3.2.2.Granulométrie 39
III.3.2.3.Déminiralisation 40
III.3.2.4.Déprotéinisation 40
III.3.2.5.Désacétylation 41
III.3.2.6.Perte en poids 42
III.3.2.7.Rendement 44
III.3.2.8.Taux de cendres 45

III.3.2.9.Taux de gonflement 45
III.3.2.10.Test de solubilité 46
III.3.2.11.pH de zéro charge (pH_{pzc}) 47
III.3.2.12.Résultats FTIR 48
III.4.Application à l'adsorption des colorants 52
III.4.1.Mode opératoire 53
III.4.1.1.Etablissement de la courbe d'étalonnage 53
III.4.1.2.Cinétique de biosorption 54
III.4.2.Résultats et discussions 55
III.4.2.1. Courbe d'étalonnage 55
III.4.2.2. Biosorption 56
Conclusion générale 59
Références bibliographiques

Introduction générale

Afin de répondre aux multiples défis auxquels nous sommes confrontés tels que la disparition progressive des ressources fossiles, la limitation des rejets des gaz à effet de serre, la valorisation des déchets ou la pollution causée par les plastiques ; le développement des biopolymères a subi une forte accélération au cours des dernières années. Ce sont des polymères naturels issus des ressources renouvelables de plantes, d'algues ou d'animaux. Ces biopolymères possèdent des propriétés physicochimiques et biologiques importantes permettant des applications ciblées dans des domaines très variés notamment dans les secteurs de l'emballage, textile, l'agriculture, pharmaceutique, l'électronique, environnementale et biomédical. Parmi les biopolymères, les polysaccharides constituent une ressource renouvelable abondante, disponible partout sur la planète, puisqu'ils sont produits par les règnes végétal (amidon, cellulose), animal (chitine, chitosane) et bactérien (xanthane, polyhydroxyalcanoate).

Les industries des produits de mer transforment et conditionnent les produits récoltés. Durant la transformation, seulement la viande est utilisée, tandis que la tête et les coquilles ou les carapaces sont générées comme des déchets. Ceci résulte en la génération de quantités importantes de déchets. L'accumulation de ces déchets est une préoccupation environnementale majeure. La solution effective est la valorisation des déchets par extraction de substances à intérêt commercial tel que la chitine et le chitosane, qui en dérive, ayant des propriétés physicochimiques et biologiques importantes permettant des applications ciblées dans des domaines très variés notamment dans les secteurs de l'emballage, textile, l'agriculture, pharmaceutique, environnementale et biomédical. En effet, le nombre de publications scientifiques ayant trait au chitosane connaît une progression exponentielle. Le chitosane qui peut être utilisé sous différentes formes physiques, présente un potentiel d'applications considérable. Cependant, la qualité du chitosane obtenue reste tributaire de la source de la chitine, des conditions de stockage des déchets de crustacés et du procédé utilisé.

L'intérêt de ce travail est donc la valorisation des déchets de crevettes par extraction de biomacromolécules d'intérêt. Bien qu'il existe différentes méthodes d'extraction du chitosane à partir des carapaces de crevettes, la plupart prennent beaucoup de temps, leur rendement est faible ou ont une influence sur les caractéristiques du produit obtenu. Dans cette étude deux méthodes d'extraction sont à envisager et une étude comparative va être

entreprise pour optimiser les paramètres d'extraction et éventuellement les propriétés des biopolymères extraits en vue d'une application pharmaceutique.

Pour ce faire, ce manuscrit est structuré en deux parties :

- Une étude bibliographique, organisée en deux chapitres :
  - Le premier chapitre présente des généralités sur les biopolymères (définition, classification, propriétés et application) suivi d'une présentation des polymères utilisés dans cette étude : chitine et chitosane (structure, propriétés et applications).
  - Le deuxième chapitre est consacré à une recherche sur les méthodes d'extractions et de caractérisation instrumentale du chitosane.
- Une étude expérimentale, organisée en un seul chapitre, représente notre travail pratique relatif à l'extraction de la chitine et du chitosane à partir des déchets de crevettes par deux procédés de chauffage, leurs caractérisation physico-chimique et enfin la biosorption de quelques colorants comme application.

Ce travail est, enfin, clôturé par une conclusion générale qui résume les principaux résultats obtenus et quelques perspectives.

Chapitre I :

Biopolymères : Chitine et Chitosane

I.1.Généralités sur les biopolymères

Selon l'agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie (l'ADEME), les biopolymères sont des polymères naturels issus de ressources renouvelables de plantes, d'algues ou d'animaux. Selon cette définition trois grandes classes sont alors répertoriées: les polysaccharides, les protéines et la lignine [1].

Les polysaccharides peuvent être les matériaux de demain qui seront pleinement utilisés quand les ressources en pétrole commenceront à se tarir. Ces polymères sont, en effet, des substances uniques dans le sens où elles sont naturelles, abondantes, issues de ressources renouvelables et exploitables dans de nombreux pays. Ils présentent de nombreuses propriétés à la fois physico-chimiques et biologiques. Ces ressources sont par nature biodégradables puisqu'elles sont d'origine naturelle. Les polysaccharides peuvent être d'origine végétale (cellulose, amidon, alginates, carraghenanes), animale (chitine et chitosane) ou bactérienne (xanthane, gellane). Chaque année, la terre en produit mille milliard de tonnes [2].

D'un point de vue chimique, les polysaccharides, nommés aussi polyoside ou polyholosides, sont des biopolymères hydrophiles et stables, formés par condensation d'un grand nombre de molécules d'oses, soit toutes identiques (homopolyosides), soit de types différents (hétéropolyosides) [3, 4].

Les polysaccharides sont d'un grand intérêt pour l'homme et ont de nombreuses applications industrielles et pharmaceutiques. Dans notre travail, nous intéressons au chitosane; biopolymère possédant des propriétés physico-chimiques intéressantes [5, 6].

I.1.1. Définition

Depuis quelques années, les termes biopolymère, polymère biosourcé ou encore polymère biodégradable sont au cœur de notre société mais il convient de ne pas les confondre. A ce sujet, une publication récente de l'IUPAC permet de clarifier cette terminologie. Ainsi, un biopolymère est défini comme étant constitué par un genre de biomacromolécules, elles-mêmes formées par des organismes vivants. C'est le cas des protéines, des acides nucléiques ou encore des polysaccharides. Lorsque l'on parle de polymère biosourcé, le terme biosourcé signifie que le polymère est composé ou issu en partie ou complètement de la biomasse.

Cette caractéristique présente un avantage certain puisqu'elle limite l'utilisation des ressources fossiles [7].

I.1.2. Différentes familles des biopolymères

A. Biopolymères d'origine biologique : peuvent être classés en trois familles :
Les polymères issus directement des ressources végétales et animales comme les polysaccharides, les protéines et les polynucléotides. Les polymères issus d'origine bactérienne comme les Polyhydroxyalcanoates (PHA). Les polymères obtenus indirectement par polymérisation de monomères eux-mêmes issus de ressources végétales comme l'acide lactique, résultant de la fermentation de sucres ou encore des composés monomères réactifs dérivés d'huiles végétales [7].

B. Biopolymères synthétiques : Ils sont Obtenus par voie fermentaire, on les appelle biopolymères synthétiques ou chimio synthétiques en raison de leur mode de fabrication. En effet celui-ci consiste en une polycondensation de monomères naturels ou identiques aux naturels. Le plus connu est le PLA (Poly Acide Lactique) [7].
La figure (I.1) représente les différentes familles des biopolymères

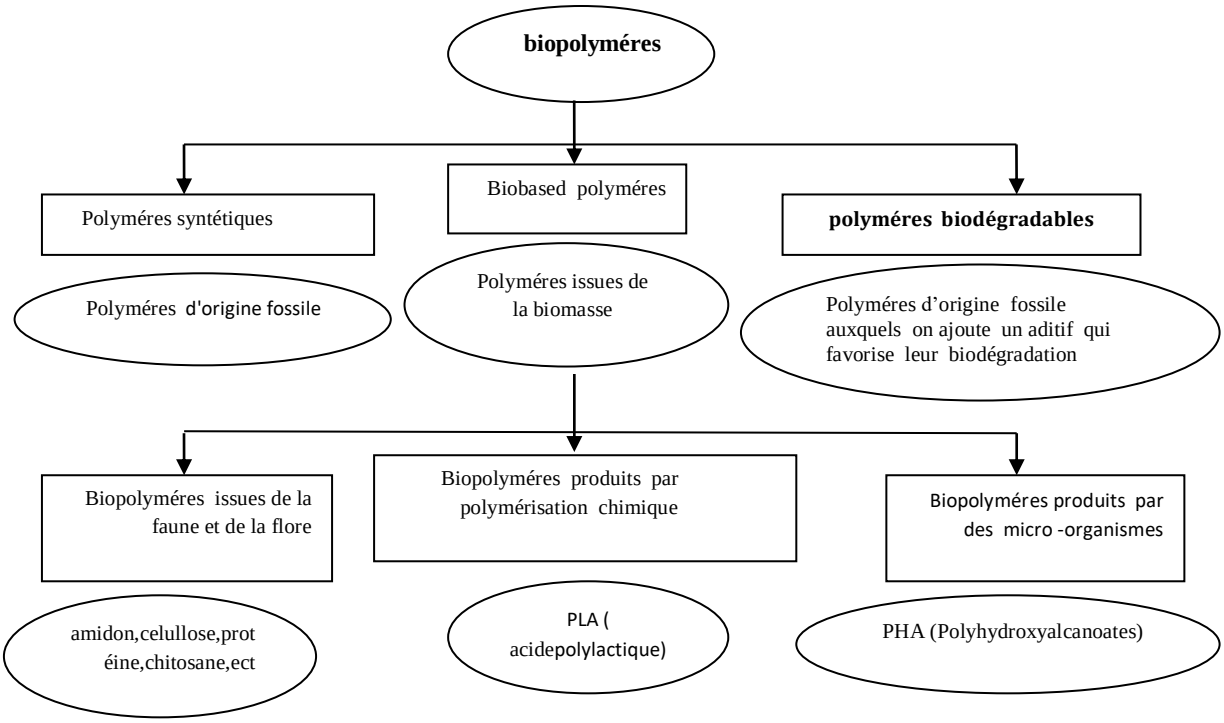


Figure I.1 : Grandes familles des biopolymères [8].

I.1.3. Propriétés des biopolymères et leurs applications

De par leur structure chimique, les biopolymères présentent des propriétés particulières et intéressantes utilisés dans des domaines très variés tels que l'emballage, l'agriculture, la construction, l'automobile, l'électronique et le textile. Ils sont également employés pour des applications à forte valeur ajoutée dans le domaine médical (implants vasculaires, fils de suture, vis et broches, ligaments artificiels…) [7]. Le tableau I.1 présente les propriétés spécifiques et les applications attendues de quelques biopolymères.

Tableau I.1 : Propriétés spécifiques de quelques biopolymères et les applications attendues [7].

biopolyméres	**Propriétésparticulières**	**Applications cublées**
Polyméres a base d'amidon	Antiseptiques, anti condensations, toucher naturel	Emballages, sacs, films de paillage
Polyméres a base de cellulose	Transparences, antiseptiques	Fibres, épaississant
Polyméres a base de protéine	Comestibles, perméabilité sélective aux gaz	Galénique, emballages alimentaires
Polyméres a base d'huile	siccativités	Peinture, vernis
Polyméres de synthèse(PLA)	Anti condensations, brillances, antibactériens	Emballages, fibres textiles
Polyesters bactériens	Piézoélectriques, antioxydants, Insolubilité dansl'eau	Médical, matériau ostéosythétique

I.2. Chitine

I.2.1. Historique

Ce biopolymère a été découvert en 1811 par le chimiste français Braconnot qui l'a isolé à partir d'un champignon. Il appela cette substance « fungina ». En 1823, en étudiant la cuticule de coléoptères, Odier isolait ce même polymère et le nomma « chitine » à partir du grec « χιτών» qui veut dire tunique (enrobage). Le chitosane a été découvert en 1859 par Rouget, qui, en traitant la chitine avec de la potasse concentrée à température élevée, observa un produit soluble dans une solution aqueuse acide [9]. En1894, cette substance fut nommée chitosane par Hope-Seller. 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. Cependant, les recherches se sont accélérées après la seconde guerre mondiale pour s'amplifier à partir des années 70. Le chitosane a commencé à susciter un réel intérêt en raison notamment des grandes quantités de déchets disponibles que produisaient les conserveries de crustacés [2]. Les gouvernements américain et japonais ont cherché à valoriser ces déchets et ont lancé les premiers programmes de recherche [10].

I.2.2. Définition et structure de la chitine

La chitine est un polymère formé d'une répétition d'unités de N-acétyl-D-glucosamine, de formule brute $(C_8H_{13}NO_5)_n$.C'est un biopolymère linéaire à chaine normale proche de la cellulose. La chitine est après la cellulose, le second polysaccharide le plus abondant dans la nature [11]. Elle se rencontre en abondance dans les carapaces des crustacés et des insectes, ainsi que dans la paroi des champignons, levures et certaines algues. La chitine est l'un des principaux composants de l'exosquelette des insectes et autres arthropodes (crustacés, arachnides, etc.) [12]. Elle constitue le principal constituant de la paroi cellulaire de beaucoup de champignons ainsi que dans des carapaces de crustacés tels que : homards, crevettes et crabes, et dans de nombreux insectes. Il faut savoir que la chitine n'existe pas sous une forme pure dans la nature : elle est toujours mélangée à d'autres substances (protéines, lipides et des produits minéraux comme le $CaCO_3$ et pigments).

I.2.2.1. Structure chimique de la chitine

La chitine ou poly N-acétyl-D-glucosamine est un polysaccharide dont les unités sont liées entre elles par des ponts β-1,4 glycosidiques. Elle est naturellement désacétylé au-dessus de 5% et plus [13]. La figure I.2 montre la structure moléculaire de la chitine.

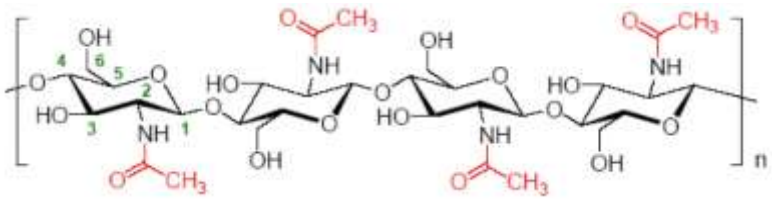


Figure I.2. Structure moléculaire de la chitine [13].

I.2.2.2. Structure cristalline de la chitine

La chitine est un produit renouvelable, non toxique, hypoallergique et surtout biodégradable et par conséquent non polluante[14]. Cependant, la chitine possède une structure cristalline polymorphe. Il existe trois sortes de chitine [15] :

- α-chitine : chaînes antiparallèles
- β-chitine : chaînes parallèles
- γ-chitine : deux chaînes parallèles et une chaîne antiparallèle

Ces chitines sont différenciées par l'organisation de leurs chaînes polymères. L'α-chitine est la plus abondante, mais il est possible d'obtenir la β-chitine à partir de l'α-chitine par un traitement convenable.

I.2.3.Propriétés physico-chimiques de la chitine

La chitine se retrouve rarement à l'état pur dans la nature. La plupart du temps, elle forme des liens faibles non-covalents avec des protéines des organismes qui l'ont produite [16].

La chitine et le chitosane sont caractérisés par leur masse molaire et leur degré d'acétylation (DA). La détermination de la masse molaire nécessite la mise en solution du polymère. Malgré la similarité structurale, la chitine est insoluble dans les solvants usuellement utilisés pour la cellulose. Quelques autres systèmes de solvants « exotiques » furent ainsi mis en place afin de contourner cette situation. On peut regrouper ces systèmes en trois catégories : les solutions aqueuses de sels neutres, les solvants acides, et les solvants organiques neutres (Tableau I.2).

La chitine, du point de vue chimique, est un composé pratiquement inerte, insoluble aussi bien dans l'eau que dans les acides dilués, les bases concentrées ou diluées et les solvants organiques les plus courants. Les acides concentrés la dégradent. Par chauffage, la chitine se décompose vers 250 ºC sans fondre. Elle est soluble dans les mélanges diméthylformamide (DMF)/chlorure de lithium(LiCl) ou diméthylacétamide (DMAc)/LiCl.

Tableau I.2 : Solvants répertoriés pour la chitine [17]

Catégorie	Solvant	Caractéristiques
Solutions aqueuses de sels neutres	Solutions aqueuse concentrées de LiCNS, $Ca(CNS)_2$,$Cal_2.CaBr_2$, $CaCl_2$	Le pouvoir de solubilisation varie selon le sel: LiCNS> $Ca(CNS)_2$> Cal_2>$CaBr_2$>$CaCl_2$. Nécessite des températures élevées pour la dissolution (95°C pour LiCNS). Cela peut engendrer une dégradation de la chitine.
Solvants acides	Solutions aqueuses de HCl (>8,5M), H_2SO_4 et H_3PO_4 HCOOH (98%)	Production de dérivés O-sulfonés avec H_2SO_4. Hydrolyse rapide de la chaine de chitine. Solubilisation d'un dérivé O-formylchitine plutôt que la chitine elle-même. Nécessite plusieurs cycles de congélation /décongélation. Le temps de solubilisation est très long pour la chitine- (~3 semaines). Hydrolyse rapide de la chaine de chitine.
Solvants acides	HCOOH (98%) + DCA ou TCA (20-50% p/p) CH_2.Cl2/ TCA	Hydrolyse lente de la chaîne de chitine. La chitine- est peu soluble. Hydrolyse de la chaîne de chitine.
solvantsorganiques neutres	DMF/N_2O_4 $CF_3CH(OH)$ CF_3 et CF_3COCF_3 ' $6H_2O$ DMAc / LiCl (2-9% p/p) et NMP/ LiCl (2-9% p/p)	Pas de dégradation ni de modification chimique. Critiqués pour leurs effets néfastes sur la couche d'ozone (CFC ....). Pas de dégradation ni de modification chimique.
Solvants organiques neutres	MeOH/ $CaCl_2$.2H $_2$O (60-70% p / v)	Pas de dégradation ni de modification chimique. Le solvant seul est sujet à la précipitation. Détruit la structure cristalline de la chitine.

La solubilité de la chitine dans DMAc / LiCl semble dépendre du degré d'acétylation. Plus le degré d'acétylation est élevé, plus le pourcentage de solubilité est élevé. Cela démontre l'importance du groupement N-acétyle dans le mécanisme de solubilisation. La toxicité relative de ces solvants et la qualité des solutions obtenues expliquent d'une part que la mise en œuvre de la chitine et donc sa valorisation soient difficiles et d'autre part que sa caractérisation ne soit pas aisée. La masse molaire initiale de la chitine est de l'ordre de 800 000 à 1000000 g/mol et elle est généralement complètement acétylée.

La chitine est un produit naturel biodégradable, biocompatible, bio-actif, possédant une bonne résistance mécanique et non toxique. Elle peut être hydrolysée facilement par le lysozyme et par les chitinases [17].

I.2.4. Les Sources de la chitine

La chitine est produite par les insectes (blattes, coléoptères, fourmis), les arachnides (scorpions, araignées), les animaux marins (crabes, crevettes, homards, langoustines, calamars) et les champignons (Tableau I.3). Dans le règne animal, la chitine est un élément de soutien des téguments de certains invertébrés (insectes, crustacés, mollusques, nématodes).

On la retrouve en particulier dans la composition de leur cuticule et à un degré moindre au niveau de la paroi intestinale, du tube digestif, des trachées, des tendons musculaires, et du squelette interne [18]. La figure (I.3) montre les sources potentilles de la chitine.



Figure I. 3 : Sources potentielles de la chitine

La chitine est également un constituant majeur des endosquelettes des céphalopodes comme les sèches et les calamars. Au niveau des autres règnes biologiques, elle est signalée dans les parois cellulaires des champignons et de certaines algues chlorophycées. La chitine est également présente dans certaines levures et bactéries [10].

Tableau I.3 : Sources potentielles de chitine [5]

Source de chitine	Teneur en chitine (%)
Crabe marbré (Grapsus marmoratus)	10
Crabe rouge (Portunus puber)	10
Le crabe comestible	70
Crabe araignée (Maia squinada)	16
Langouste (Palinurus vulgarisrus)	25
Homard sauterelle (Scyllarus arctus)	32
Crevette (Palaemon fabricius)	44
Seiche (sepia officinal)	20

Le choix de la méthode d'obtention de la chitine est fonction de la proportion de polysaccharide contenu dans la source considérée. Chez les insectes, la chitine constitue environ 1% de la masse fraîche de l'animal, ce qui explique que son exploitation commerciale ne soit pas envisagée. Chez les micro-organismes, le pourcentage de la chitine peut atteindre plus de 20% de la masse fraîche de la cellule. Toutefois, l'extraction à partir de microorganismes, n'a jusqu'ici été effectuée qu'à titre expérimental [18, 19]. Le tableau I.4 donne la composition des carapaces de quelques crustacés.

Tableau I.4 : Composition des carapaces de quelques crustacés [20]

Matières sèches				
Composition(%)	**Déchets de crevettes**		**Déchets de langoustes**	**Déchets de crabes**
	Tête	**Corps**		
Chitine	27	13.5-17.5	11-15	13-15
Protéines	40	29-37.5	20-44	30-35
$CaCO_3$	33	25-27	40	50
Matières solubles et autres	0	32.5	4	0-7

I.3. Chitosane

I.3.1. Historique

Le chitosane a d'abord été obtenu à partir de la chitine par C.Rouget, lors de l'ébullition de la chitine dans une solution alcaline concentrée et en notant que le composé résultant était soluble dans les acides organiques. F. Seiler a confirmé en 1894 que le chitosane est la forme désacétylée de la chitine et lui a donc donné son nom actuel.

En 1920 la production de la chitine a été commencée mais l'identification de la structures des deux biopolymère chitine et chitosane n'a été identifiée que 50 ans plus tard a travers la cristallographie et la spectroscopie infrarouge [21].

En 1940 les chercheures ont découverts les avantages et les intérêts de la chitine et du chitosane dans différentes domaines comme le domaine médical et dans le traitement des eaux [21]. Actuellement, la chitine et le chitosane sont produites à partir des carapaces des crevettes, et cette production est économique [14], et est considéré comme une source renouvelable [22].

I.3.2. Définition et structure chimique

Le chitosane est un polysaccharide formé des copolymères de glucosamine et acétylglucosamine. Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine, principalement des carapaces de crustacés [14]. Sa structure chimique, représentée sur la figure I.4, résulte de l'enchaînement d'unités de répétition N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine liées en β (1→4). Le degré d'acétylation (DA) différencie la chitine du chitosane. Bien que le terme «chitosane» soit habituellement limité à toute chitine suffisamment N-déacétylée pour être soluble en milieu acide dilué, il n'existe pas de nomenclature officielle proposant la limite précise entre les deux termes. En conséquence, tout échantillon avec des degrés d'acétylation résiduels (DA) ≤ 30% est nommé chitosane.

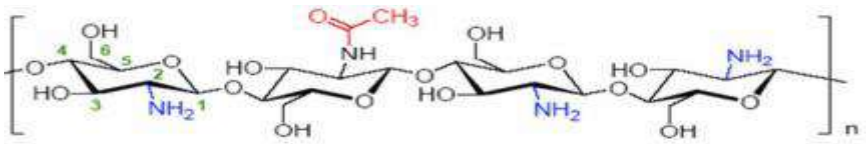


Figure I. 4. Structure chimique du chitosane [13]).

I.3.3 Sources de chitosane

Il faut retenir que la source majeure du chitosane provient de la désacétylation de la chitine obtenue à partir de crustacés. La production de chitosane provient, en effet, des crevettes et des crabes qui représentent les deux sources naturelles les plus abondantes. Ce sont donc des produits d'origine animale [23]

En revanche, le chitosane est une substance très peu répondue dans la nature. Elle n'est signalée que dans les exosquelettes de certains insectes (la paroi abdominale des reines de termites) et dans la paroi cellulaire d'une classe particulière de champignons (les zygomycetes), de bactéries et de levures. Il n'ya pas donc de sources primaire de chitosane exploitable, la production étant assurée par transformation de déchets issus de la pèche. [9]

I.3.4 Propriétés du chitosane

Les chaînes macromoléculaires du chitosane sont caractérisées par leur masse moléculaire et leur degré d'acétylation. La troisième caractéristique importante porte sur la cristallinité du polymère (le chitosane est une substance semi-cristalline). D'un point de vue chimique, sa structure est similaire à celle de la cellulose. Par contre, la présence d'une fonction amine primaire de pKa proche de 6,3 (le pKa est fonction du DA) en position 2 du noyau glucopyranose confère au chitosane des propriétés chimiques et physico-chimiques qui en font un polymère possédant un ensemble de propriétés remarquables (tableau I.5).

Ce biopolymère présente également des propriétés biologiques variées (Tableau I.5). Les propriétés intrinsèques du chitosane influent sur sa solubilité en milieu aqueux, son hydratation, sa structure tridimensionnelle, sa viscosité, son aptitude à participer dans des interactions ioniques, sa capacité à lier des molécules organiques et des sels de métaux lourds et autres, et sa facilité à subir des modifications chimiques qui permettent de créer une multitude de dérivés aux propriétés physico-chimiques et biologiques variées[24]

Le chitosane est caractérisé par son degré de dés-acétylation, sa viscosité et son poids moléculaire, conformation et longueur de la chaine moléculaires.

Tableau I.5: Propriétés du chitosane

Propriétes	**Description**
Physico-chimique	Polyamine linéaire hydrophile Structure semi-rigide réactive Matériau brut non poreux
Polyélectolytes en milieu acide	Polymére cationique à forte densité de charge
Biologiques	Matériau non toxique Substance biocompatible Biorésorsable et biodégradable Activité antibactérienne et antifongique Agent hypocholestérolémiant Activité hémostatique Stimule la croissance cellulaire

I.3.4.1. Propriétés physico-chimiques

Le chitosane est à la fois une macromolécule polyaminée et polyhydroxylée, il est insoluble dans l'eau et dans les solutions alcalines concentrées ou diluées et dans les solvants purs et les acides concentrés, en raison de l'impossibilité d'hydrater le matériau. Par contre il est soluble dans la pluparts des solutions organiques acides [25].

En général, le chitosane est parfaitement soluble dans des solutions diluées (0,1 % - 1%) d'acide nitrique et chlorhydrique. L'acide le plus couramment utilisé pour préparer une solution de chitosane est l'acide acétique dilué. Le PKa du chitosane est approximativement 6,3. Il se solubilise et devient cationique quand le pH est ≤ 6 soit à pH de 3-4. Les groupements amines portés par le carbone 2 subissent une protonation et deviennent chargés positivement, le chitosane devient alors un polyélectrolyte cationique hydrosoluble de forte densité de charge. A un pH de 6 les groupements ne sont plus ionisés et le chitosane précipite. La solubilité du chitosane est un paramètres difficile à contrôler car la valeur du degré de désacétylation (DD) influence fortement sa solubilité [26]. Le pKa étant fortement dépendant du degré de désacétylation, la solubilité du chitosane est aussi dépendante de la méthode de désacétylation [27], plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amine libres, plus le chitosane est soluble. La distribution des groupements amine acétylé sur la chaine polymérique peut contrôler aussi la solubilité du chitosane dans des solutions données [28].

Le degré de désacétylation (DD) est le pourcentage molaire de l'élimination des groupements N-acétyle. Ce paramètre (DD) influe sur toutes les propriétés physico-

chimiques (masse moléculaire en poids, viscosité, solubilité, …) du chitosane et apparaît donc comme le plus important.

La viscosité du chitosane dépend de son degré de désacétylation : plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amine libres, plus le chitosane est soluble, et plus sa viscosité est importante. La viscosité dépend aussi de la concentration (elle augmente avec la concentration), de la température (elle chute lorsque la température augmente), et du pH (plus il est bas plus la viscosité est élevée) [29].

Le chitosane possède aussi des propriétés chimiques attribuées à la présence des groupes amines et hydroxyles. Ces groupes permettent des modifications chimiques du chitosane telles que l'acylation, l'alkylation, la formation de base de Schiff, l'alkylation réductrice, la carboxyméthylation, la carboxyalkylation, ainsi il est très stable en phase solide (sèche) [30].

I.3.4.2. Propriétés biologiques

Le chitosane peut être un substitut des milieux biologiques, du fait que les liaisons glycosidiques et les résidus N-acétyle-glucosamine se retrouvent dans la structures des matrices extracellulaires de la plupart des tissus vivants. Le chitosane est non toxiques et biodégradables. Il est biocompatible et biorésorbable. Il possède un caractère antithrombogénique, hémostatique et anti tumorale. Il ne présente, par contre, aucun comportement antigénique. Le chitosane est également antifongique, antibactérien et un très bon cicatrisant [31]. Sa particularité d'être charger positivement en milieu acide lui permet de réagir avec tous les composés biologique chargés négativement ex : parois de bactéries, lipides, membranes des muqueuses [12]. Le chitosane a également des propriétés immunologiques, antitumorales [26].

I. 4. Applications

I.4.1. Purification de l'eau usée

La plus large utilisation du chitosane est dans la clarification des eaux usées et des effluents. La prise de conscience des problèmes écologiques et sanitaires liés aux métaux lourds et les pesticides, et leur accumulation dans la chaîne alimentaire a incité la nécessité d'une purification rigoureuse de l'eau industrielle avant sa décharge [32].

Grâce à sa structure moléculaire unique, le chitosane a une affinité élevée pour certaines classes de colorants, y compris les colorants sulfurés et les colorants à base de naphtol. Il est aussi utilisé dans la séparation des colloïdes et les particules dispersées dans les déchets de transformation d'aliments [32].

I. 4.2. Agriculture

La chitine et le chitosane et ses dérivés ont des propriétés antifongiques et protectrices des plantes, déclenchant un mécanisme de défense chez les plantes contre les infections et les attaques de parasites, même à de très faibles concentrations. Il est utilisé sous forme de solution ou de revêtement de la semence. Il agit à différents niveaux, en renforçant le système racinaire et en épaississant la tige. Il agit aussi comme un fertilisant en accélérant la germination et la croissance des plantes [32].

I. 4.3. Médical

De par sa biocompatibilité avec les tissus du corps humain, le chitosane a démontré son efficacité pour toute forme de pansements : peau artificielle, pansements cornéens, fil de suture. En chirurgie dentaire, le chitosane est utilisé dans les implants ou dans la cicatrisation des gencives. Le chitosane et ses dérivés sont utilisés dans les organes artificiels comme le foie, les nerfs, les os, la peau, les cartilages, les vaisseaux sanguins...etc. [33]. En outre, c'est un bon support pour le transport et le relargage lent de principes actifs médicamenteux pour des applications à la santé humaine et animale [34]. Senel et McClure [36] ont montré les applications potentielles du chitosane dans la médicine vétérinaire.

Dans l'organisme, le chitosane n'étant pas hydrolysé par les enzymes digestives humaines, possède une charge ionique positive, il peut se lier facilement aux molécules chargées négativement comme les lipides, les graisses et les acides biliaires. Ils forment une masse qui ne peut pas être absorbée par l'estomac ; celle-ci est éliminée par voies naturelles. De cette façon le chitosane permet de diminuer le taux de cholestérol et est devenu le numéro un des produits amincissants naturels. En plus, le chitosane se comporte comme antimicrobien, antiviral, anti cancer [5, 35 ,36].

I. 4.4. Domaine cosmétique

Le chitosane forme à la surface de la peau un film protecteur et tenseur, capable de fixer d'autres principes actifs pour la peau. Le chitosane est aussi utilisé comme filtre solaire et rentre dans la composition de la pâte des dentifrices, crème de soins, shampooing,…etc. De nombreux brevets ont été déposés dans ce domaine [37,38]. Le tableau I.6 présente quelques applications du chitosane dans différents domaines d'exploitation.

Tableau I.6. Différentes applications du chitosane [2].

Domaines d'exploitation	**Applications**
Potentiel biomédical	Peaux artificielles Reconstructions osseuses Implants dentaires Sutures chirurgicales
Agriculture	Mécanisme de défensive Stimule la croissance des plantes Enrobage (protection) Libération de fertilisants et nutriments
Traitement des eaux	Polymère écologique Pouvoir séquestrant (métaux lourds colorants etc.) Diminution de la turbidité Diminution des odeurs Bactéricides
Alimentaire	Non digestible (diète aux fibres) Hypocholestérolémiant Agent de conservation Stabilisateur Antimicrobien Enrobage protecteur (fruits)
Cosmétique	Crèmes Traitement de l'acné Produits hydratants Formulation de dentifrices Formulation de shampoings
Biopharmaceutique	Anti tumoraux Anti coagulants Bactériostatiques Libérations contrôlées (matrices)
Autres domaines **Chimie** **Biotechnologie** **Papeterie** **Textile** **Chromatography** **Photography** **Enology** **Acoustique**	Catalyse Capteurs chimiques Super-absorbants Cristaux liquides Immobilisation des cellules et des enzymes Membranes Additifs pour pâtes à papiers Agent antibactérien et imperméabilisant dans la filière textile Films photographiques, extraction de l'argent Clarification, désacidification et stabilisation des vins Traitement préventif ou curatif des vignes Membrane des haut -parleurs

Chapitre II :

Extraction et caractérisation instrumentale de chitine et du chitosane

La chitine est obtenue à partir de carapaces des crustacés, déchets de l'industrie alimentaire. Les carapaces sont traitées avec de l'acide pour la déminéralisation puis avec une base pour éliminer les protéines. Le résidu obtenu constitue la chitine. Il existe deux méthodes d'extraction de la chitine et du chitosane [39]:

- Extraction par voie chimique
- Extraction par voie enzymatique

II.1. Extraction par voie chimique

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

- La déminéralisation;
- La déprotéinisation;
- Le blanchiment;
- La désacétylation et la dépolymérisation.

II.1.1. Déminéralisation

Elle 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 10 mol/L, La durée du traitement acide est de l'ordre de 1 à 48 heures à la température ambiante [40], selon la réaction suivante:

$$CaCO_3 + 2\,HCl \rightarrow CaCl_2 + CO_2 + H_2O \quad (II.1)$$

II.1.2. Déprotéinisation

A l'état naturel, la chitine se présente en association avec les protéines (Chitinoprotéine). Ces protéines sont éliminées par un traitement basique en utilisant, en général, des solutions à base de NaOH, Na_2CO_3, $NaHCO_3$, KOH, K_2CO_3, $Ca(OH)_2$, Na_2SO_3 $CaSO_3$, ou Na_3PO_4 , avec des concentrations de 0,1 à 5 mol/L. 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) [2].

II.1. 3. Décoloration

Pour les applications industrielles, la chitine obtenue à partir des ressources crustacées doit être décolorée après les traitements acides et alcalins. Le pigment dans les carapaces de crustacées forme un complexe avec la chitine. Il peut être enlevé par des réactifs tels que l'éthanol, l'éther, solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [41, 42].

II.1. 4. Désacétylation

La désacétylation signifie l'hydrolyse des groupements acétyles présents dans la chitine pour avoir des groupes amines. D'habitude, la chitine est partiellement désacétylée par N-désacétylation alcalines en utilisant des processus industriels pour produire différents polymères [43]. La figure (II.1) Procédé d'extraction de la chitine et du chitosane.

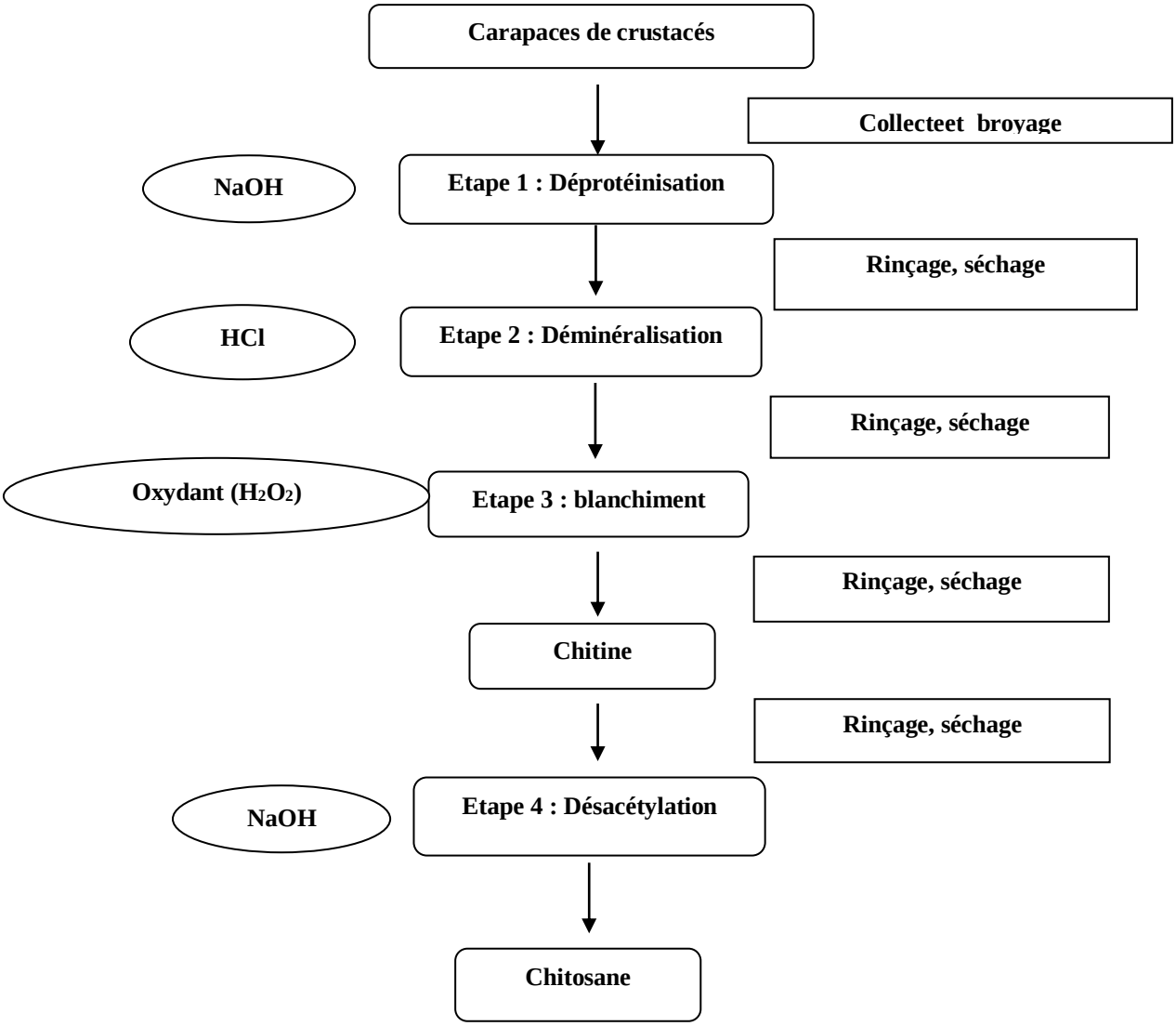


Figure II.1: Procédé d'extraction de la chitine et du chitosane [44].

II. 2. Extraction par voie enzymatique

II. 2.1. Voie fermentaire

Le principe consiste à faire usage d'enzymes et de bactéries, par exemple, Pseudomonas aeruginosa K-187, source traditionnelle pour la production de protéases, chitinases et lysozymes [39]. L'intérêt est de fermenter les coproduits des crustacés.

II. 2.2. Déprotéinisation et déminéralisation enzymatiques

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

II. 2.3. Désacétylation et dépolymérisation enzymatique

On utilise des chitinases ou chitosanylases pour la désacétylation enzymatique. La dépolymérisation enzymatique ou chitinolyse est plus spécifique et plus contrôlable que la dépolymérisation chimique [39]. Les chitinases et chitosanases hydrolysent les liaisons glycosidiques. La figure (II.2) représente la désacétylation enzymatique de la chitine en utilisant la chitine désacétylase.

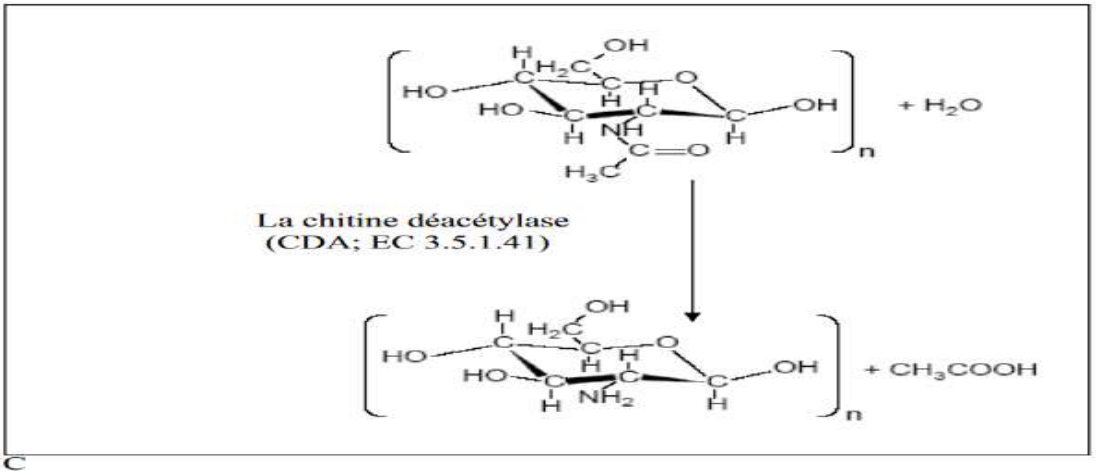


Figure II.2: Désacétylation enzymatique de la chitine [45]**.**

II.3. Méthodes instrumentales pour la caractérisation de la chitine et du chitosane

II.3.1. Microscope électronique à balayage (MEB)

Un microscope électronique à balayage (MEB) sert à balayer un faisceau d'électrons focalisé sur une surface pour créer une image. Les électrons du faisceau interagissent avec l'échantillon et produisent divers signaux qui pourraient être utilisés pour obtenir des informations sur la surface, topographie et composition. Avec suffisamment de lumière, l'œil humain pourrait distinguer deux points distants de 0,2 mm, sans l'aide de lentilles supplémentaires. Cette distance était appelé le pouvoir de résolution ou résolution de l'œil. Une lentille ou un assemblage de lentilles (un microscope) pourrait être utilisé pour agrandir cette distance et permettre à l'œil de voir les points encore plus rapprochés que 0,2 mm.) [46]

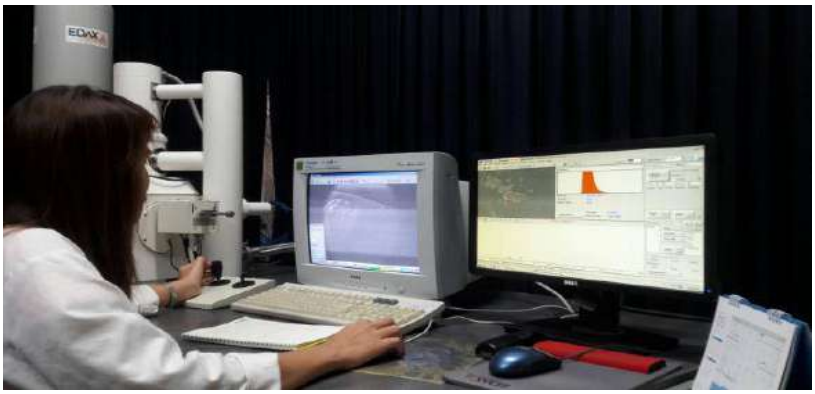


Figure II.3 : Microscope électronique à balayage (MEB) (LEO, modèle 1450 VP, Royaume-Uni) [46]

II.3.2. Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X (DRX) également connue sous le nom de cristallographie aux rayons X est définie comme une technique analytique utilisée pour identifier la phase d'un matériau et fournir des informations sur les dimensions des cellules unitaires. Un élément clé de toute diffraction est l'angle entre le rayon incident et diffracté. Généralement, la XRD est basée sur un rayon diffracté de rayons X monochromatiques et un échantillon cristallin où la structure cristalline agira comme réseaux de diffraction tridimensionnels pour les longueurs d'onde des rayons X. Ceci est similaire au espacement des plans dans un réseau cristallin [47, 48, 49].



Figure II.4 : Diffractomètre des rayons X (DRX) (Bruker, phaseur modèle D2, Allemagne).

La diffraction des rayons X est maintenant une technique courante pour l'étude des structures et espacement atomique du cristal [47, 48, 49].

II.3.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) est l'une des méthodes de spectroscopie infrarouge. Le rayonnement infrarouge de différentes longueurs d'onde est envoyé sur l'échantillon où une certaine quantité de rayonnement sera absorbé par l'échantillon tandis que les restes seront transmis. Un spectre infrarouge représente une empreinte digitale d'un échantillon avec pics d'absorption. Cela formera alors un spectre montrant l'absorption et la transmission de la molécule échantillon qui correspondent aux fréquences de vibrations des liaisons des atomes qui composent le matériau. Le spectre est unique pour le matériau car il a la combinaison unique d'atomes et aucun autre composé ne peut produire le même spectre. De plus, la taille des pics du spectre indique directement la densité du matériau présent [50, 51]. La figure (II.5) représente un Schéma du principe de spectroscopie FTIR.

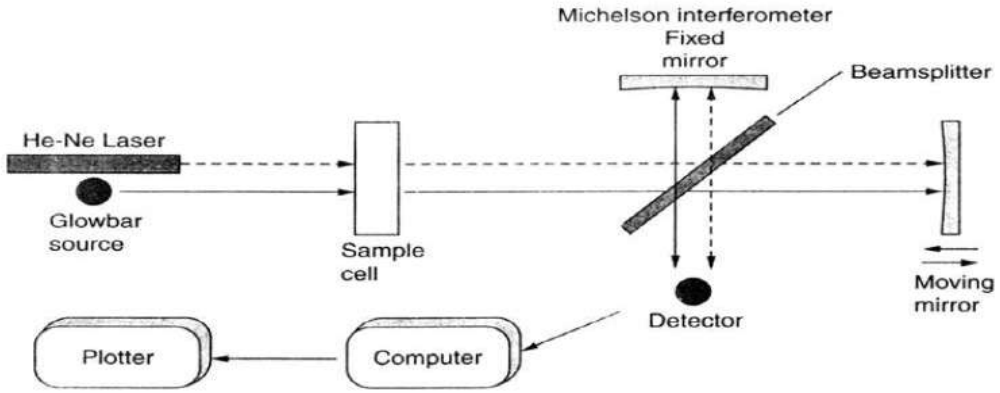


Figure II.5 : Schéma du principe de spectroscopie FTIR [52]

liu et al. (2012) ont rapporté que la chitine et le chitosane contiennent trois bande caractéristique qui sont 1577 cm^{-1}, 1654 cm^{-1} et 2932 cm^{-1} correspondant aux vibrations des groupes -C-O ; $-CO-CH_3$ et NH_2 respectivement. De plus, les unités polysaccharidiques sont représentées par des bandes comprises entre 890 et 1156 cm^{-1} [53]. Le Tableau (II.1) récapitule l'attribution des bandes d'absorption caractéristiques du chitosane.

Tableau II.1: Nombres d'ondes et groupe chimique des bandes d'absorption FT-IR pour le chitosane [54]

Nombre d'onde (cm^{-1})	**Groupe chimique**
3450	Groupe hydroxyle OH
3360	vibration d'élongation de groupe NH
2920, 2880, 1430, 1320,	vibrations d'élongation symétrique ou asymétrique des CH_2
1275,1245	Attribué au cycle pyranose
1730	Vibration du groupe carbonyle
1660	C = O dans le groupe amide (bande amide I)
1560	Vibration de flexion NH dans le groupe amide
1590	NH_2 dans le groupe amino
1415, 1320	Vibrations OH, CH dans le cycle
1380	CH_3 dans le groupe amide
1255	Groupe C – O
1150–1040	–C – O – C– dans la liaison glycosidique
850, 838	Groupe CH_3COH

II.3.3. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonnance magnétique nucléaire est une propriété de certains noyaux atomiques possédant un spin nucléaire comme ^{1}H et ^{13}C. Lorsqu'ils sont soumis à un champ électromagnétique, le plus souvent sous forme d'impulsions, les noyaux atomiques peuvent absorber l'énergie du rayonnement puis la relâcher lors de la relaxation. Ce phénomène permet donc l'observation des propriétés quantiques magnétiques des noyaux dans les phases gaz, liquide ou solide. Seuls les atomes dont les noyaux possèdent un moment magnétique donnent lieu au phénomène de résonnance [55].

La spectroscopie de RMN-^{1}H fait résonner les protons, elle a pour objectif la détection et la connaissance de l'environnement des protons dans une molécule et elle permet de déduire la structure dans ses moindres détails de la molécule. La figure (II.6) montre un spectre RMN-^{1}H d'une chitosane à faible masse moléculaire.

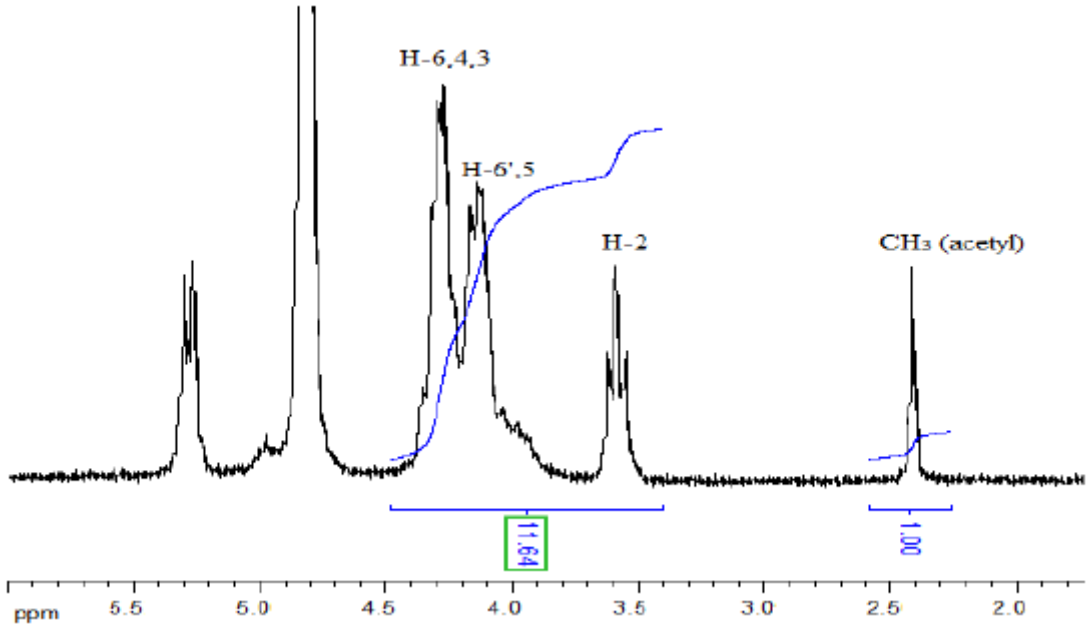


Figure II.6 : Spectre RMN 1H du chitosane (à faible masse) [56]

Chapitre III :

Partie expérimentale

III.1.Introduction

Cette étude expérimentale, réalisée au sein du laboratoire d'analyse Physico-chimique au niveau du hall technologique (Université de Médéa), a été consacrée à la valorisation des déchets de crevettes par extraction de biomolécules (chitine et chitosane) pouvant être utilisées dans plusieurs domaines (environnementale, pharmaceutique, cosmétique, biomédicale, agronomie…)

Pour ce faire, notre étude expérimentale comporte deux parties :

1. La première partie est consacrée à l'extraction des biomolécules et leurs caractérisations. L'une des étapes d'extraction nécessite un chauffage à une température élevée. De ce fait, nous avons choisis deux méthodes de chauffage : le chauffage classique en utilisant une plaque chauffante et chauffage par induction électromagnétique.
2. La deuxième partie est relative à l'utilisation des biopolymères pour l'adsorption des colorants comme une application environnementale.

III.2. Matériels et Produits :

III.2.1. Matériels:

L'ensemble du matériel utilisé pour la réalisation de cette étude est résumé dans le **Tableau III.1**.

TableauIII.1. Appareillage utilisé

Appareillage	Marque
Balance analytique	ALS 220-4N
Agitateur magnétique	AGIMATIC-N
Etuve	Memmert
Spectrophotomètre infrarouge	Bruker, Allemagne
Spectrophotomètre UV-Visible	UV MINI 1240/SHIMADZU
Plaque à induction électromagnétique	Samsang
pH-mètre	Methrom 827 pH Lab
Pompe à vide	Phywe

III.2.2. Produits chimiques

Les différents produits utilisés au cours de cette étude sont regroupés dans le **Tableau (III.2)**.

Tableau III.2. Produits utilisés dans la partie expérimentale

Produit	Pureté (%)
Acide chlorhydrique	37
Acide acétique	96
Hydroxyde de sodium	99.9
Fuschine basique	99.99
Fuschine acide	98
Violet de gentiane	99

III.2.3. Matériel biologique

Des exosquelettes (déchets) de crevettes fraîches issues de la côte Algérienne (centre) ont été utilisés dans cette étude pour extraire les deux biomacromolécules : la chitine et le chitosane.

III.3. Extraction des biomacromolécules

La grande disponibilité des déchets de crevettes et leur teneur élevée en chitine en font la source principale de ce produit. L'extraction de la chitine à partir de déchets nécessite au moins deux étapes distinctes lorsque l'on procède par la méthode chimique: la déminéralisation en milieu acide et la déprotinéisation en milieu basique. L'organigramme de la Figure (III.1) résume les différentes étapes de l'obtention de la chitine et du chitosane.

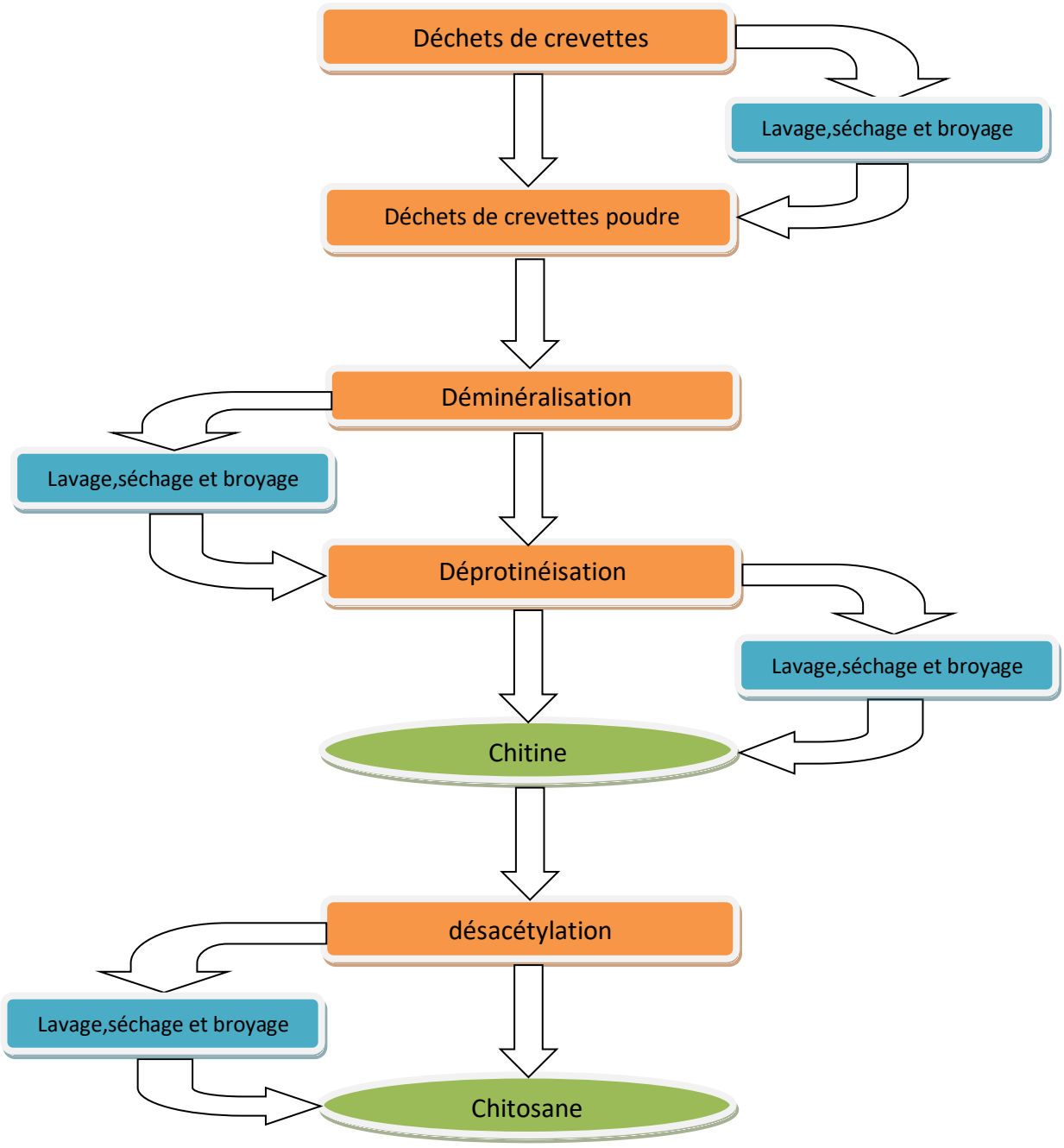


Figure III.1. Étapes d'obtention de chitine et du chitosane.

III.3.1. Modes opératoires

III.3.1.1. Prétraitement des déchets des crevettes

Les déchets des crevettes sont lavés avec de l'eau, séchés dans un four, broyés et conservés dans une boite fermée jusqu'à leur utilisation. La figure (III.2) montre les opérations du prétraitement des déchets de crevettes.

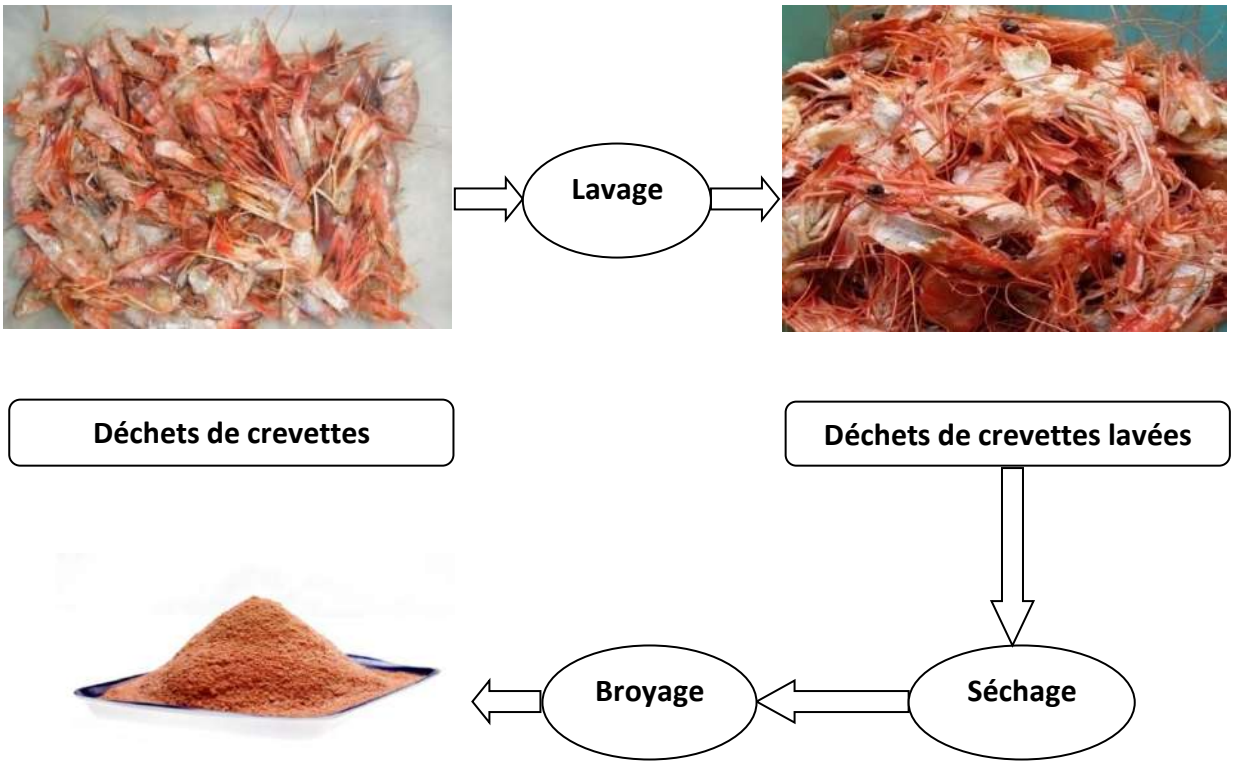


Figure III.2: Opérations de prétraitement des déchets des crevettes.

III.3.1.2. Analyse granulométrique de la poudre obtenue

La répartition granulométrique de la poudre de carapaces a été réalisée sur un lot de 9.55 g. la poudre est soumise à un tamisage à l'aide d'un tamis vibreur (Figure III.3) de type Retsch AS 200 basic.



Figure III.3 : Tamis vibreur utilisé pour l'analyse granulométrique

III.3.1.3. Déminéralisation

Les déchets, prétraités (lavés broyés et séchés), ont été minutieusement mélangées avec des solutions aqueuses d'acide chlorhydrique (HCl, 2M) (Figure III.4) en vue de débarrasser la poudre de tous les minéraux qui accompagnent les carapaces. Les sels formés ont été séparés de poudre par une simple filtration suivi d'un lavage jusqu'à l'obtention d'un résidu neutre et enfin un séchage. Les différents échantillons considérés dans cette partie d'étude et les conditions opératoires sont portés dans le tableau (III.3).



Figure III.4 : Opération de déminéralisation.

Tableau III.3: Conditions opératoires de la déminéralisation

Conditions opératoires / Echantillon considérés	Temps (h)	Température (°C)	Produits obtenus
Echantillon1	2	25	MT1 amb
Echantillon3	2	40	MT1.40
Echantillon4	**2**	**60**	MT1.60

III.3.1.4. Déprotéinisation

La déprotéinisation de la poudre déminéralisée consiste à solubiliser les protéines (environ 30-40%), présentes dans la carapace, dans une solution aqueuse. Elle peut être effectuée de façon douce ou sévère. Les méthodes douces utilisent des enzymes qui dégradent les protéines en peptides solubles dans l'eau. Ces méthodes sont peu coûteuses, mais ne permettent pas l'élimination complète des protéines. L'emploi de soude est généralement utilisé pour solubiliser une plus grande partie des protéines [57].

La poudre des déchets de crevettes déminéralisées ont été mélangées, sous agitation, avec des solutions de soude caustique (NaOH, 2M) (Figure III.5). A la fin de l'opération de désacétylation, les échantillons sont filtrés, lavés et séchés. Les différents échantillons considérés dans cette partie d'étude et les conditions opératoires sont portés dans le tableau (III.4).



Figure III.5 : Opération de déprotéinisation

Tableau III.4: Conditions opératoires de la déprotéinisation.

Conditions Opératoires / Echantillon Considérés	Temps (h)	Température (°C)	Produits obtenus
MT1 amb	2	25	MT2 amb
MT1.40	2	40	MT2.40
MT1.60	2	60	MT2.60

III.3.1.5. Désacétylation

Le produit des étapes précédentes (déminéralisation et déprotéinisation) consiste en la chitine, biomaccromolécule pouvant être transformée en chitosane par un procédé de désacetylation. Ce procédé consiste essentiellement à l'enlèvement des groupements acétyles liés au groupement amine des différentes unités de chitine.

La désacétylation de la chitine peut être effectuée par deux voies : chimique ou enzymatique [58]. La voie chimique utilise uniquement la soude comme un moyen pour aboutir au chitosane. Ce processus désacétyle efficacement la chitine en chitosane, mais il engendre un haut taux de dépolymérisation. Ceci cause une diminution de la masse molaire de la molécule [58] La voie enzymatique fait appel aux enzymes tels que la trypsine, le chitosanase et/ou le mycelia. Cependant cette méthode présente certains inconvénients majeurs dont la nécessité de quantités importantes d'enzymes pour arriver à terme de la déacétylation et également la difficulté de séparation des enzymes [57].

Dans cette étape de notre étude, nous avons choisi la méthode chimique de désacétylation. Elle consiste à mélanger la poudre déminéralisée et déprotéinisé (chitine) avec des solutions basiques fortement concentrées (NaOH, 50 %) et à haute température (140 ^{0}C). Deux types de chauffage ont été utilisés : chauffage classique (Figure III.6) et chauffage par induction électromagnétique (Figure III.7). La soude va détacher les groupements acétyles portés sur les monomères constituants la chitine. Le tableau (III.5) résume les échantillons utilisés et les conditions opératoires. A la fin de l'opération de désacétylation, les échantillons sont filtrés, lavés et séchés.



Figure III.6: Montage utilisé pour la désacétylation par chauffage classique.



Figure III.7: Montage utilisé pour la désacétylation par chauffage à induction électromagnétique.

Tableau III.5: Conditions opératoires de l'étape de désacétylation.

Conditions opératoires / Echantillons considérés	Type de chauffage	Temps (h)	Produits obtenus
MT2 amb	classique	2	MT3 amb
MT2.40	classique	2	MT3.40
MT3.60	classique	2	MT3.60
MT2 amb	Par induction	2h et laisser au repos pendant 24h	MT3 ind

III.3.1.6. Perte en poids

La détermination de la perte en poids (P) à l'issu de chaque étape (déminéralisation, déprotéinisation et désacétylation) est estimé en utilisant l'équation (III.1)

$$P\ (\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i}.100 \quad \text{(III.1)}$$

Avec :

m_i : masse initiale (g)

m_f : masse finale (g)

III.3.1.7. Rendement de l'extraction

La détermination du rendement de l'extraction (R) est déterminé à l'issu de l'étape de désacétylation (rendement en chitosane) en utilisant l'équation (III.2)

$$R\ (\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i}.100 \quad \text{(III.2)}$$

Avec :

m_i : masse initiale (g) de la poudre des déchets de crevettes

m_f : masse finale (g) obtenue après désacétylation

III.3.1.8. Taux de cendres

La détermination du taux de cendres est une technique simple qui permet de mesurer le niveau d'efficacité de la déminéralisation des déchets de crevettes. Le principe est basé sur la méthode de calcination à hautes températures allant jusqu'à 600°C. Les composés à chaine carbonés tels les protéines, les sucres, les lipides et d'autres sont éliminés. Le taux est calculé en utilisant le rapport entre la masse obtenue et le poids de l'échantillon considéré [58].

Ce test a été réalisé sur des échantillons après déminéralisation (MT1). Une masse (m_0) de chaque échantillon a été introduite dans un creuset à calcination. Les creusets ont été placés dans un four à moufle (Figure III.8) à 600°C pendant 3 heures. Les résidus obtenus ont été refroidis et pesés (m_1). Les taux de cendres (TC) sont calculés par l'équation (III.3)

$$\mathbf{TC}\ (\%) = \frac{m_1}{m_0} \times 100 \qquad \text{(III.3)}$$



Figure III.8 : Four à moufle utilisé pour la calcination

III.3.1.9. Test de gonflement

Pour mesurer le taux de gonflement (TG %), nous avons suivi les étapes décrites ci-dessous :

- Immerger une masse (m_i) de chitosane dans une quantité suffisante d'eau distillée pendant 30 mn (Figure III.9).
- Mouiller un paper filtre à l'eau distillée, le laisser bien égouter et le peser (m_1)
- Filtrer le milieu dimmersion (pour récupérer le chitosane) en utilisant le papier filtre mouillé et pesé précedement. Laisser égouter et peser (m_2).
- La masse finale du chitosane gonflé est

$$m_f = m_2 - m_1$$

- La capacité de gonflement est calculée en utilisant l'équation (III.4):

$$TG\ \% = \frac{mf - mi}{mi} \times 100 \qquad \text{(III.4)}$$

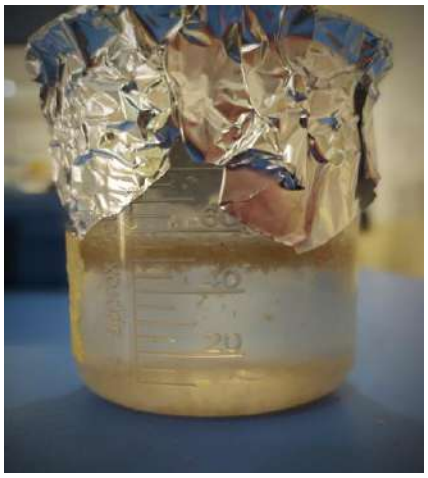


Figure III.9 : Opération du test de gonflement.

III.3.1.10. Test de solubilité

Le test de solubilité est effectué sur le produit de désacétylation (MT3) en vue de vérifier la bonne désacétylation de la chitine (MT2). Pour ce faire, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Mettre 0.1g (m_0) d'échantillon dans 40 ml d'acide acétique 1% (v/v) sous agitation magnétique pendant 18h.
- Sécher un papier filtre dans étuve à 100°C pendant une heure puis le pesé (m_1).
- Filtrer la solution de l'échantillon en utilisant le papier filtre sec.
- Sécher le papier filtre contenant le résidu à 100°C pendant une heure puis le pesé (m_2).
- La solubilité (S) est calculée en utilisant l'équation (III.5).

$$S\ (\%) = \frac{(m_0 + m_1) - m_2}{m_0} \times 100 \qquad \text{(III.5)}$$

III.3.1.11. Détermination du pH de zéro charge

Le pH à lequel la charge globale de la surface d'un matériau est nulle est connu sous le nom de point de charge zéro (pH_{pzc}). Au-dessus du pH_{pzc} le matériau est chargé négativement et au dessous de ce pH il est chargé positivement.

La détermination du pH_{pzc} a été réalisée selon le protocole décrit par Bianca et al. [59] et résumé comme suit:

- Mettre 0.5 g du produit obtenu après désacetylation (MT3) dans 60 ml d'une solution de NaCl (0.1M, pH=7) et laisser 24 h sous agitation magnétique
- Ajouter de petit volume d'une solution de HCl (0.05 M) et noter le pH après chaque ajout.
- Refaire les deux étapes précédentes en remplaçant la solution de HCl par une solution de NaOH (0.05 M)
- Tracer la courbe pH en fonction du volume de HCl et de NaOH ajouté.
- Le pH_{pzc} est donné par l'intersection de la courbe avec l'axe des ordonnées.

III.3.1.12. Analyse par spectroscopie infra-rouge

La spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (FTIR) permet d'identifier la présence de groupements chimiques spécifiques. Cette méthode d'analyse permet rapidement d'obtenir des spectres IR d'échantillons solides et liquides sans nécessiter beaucoup de manipulations au préalable. Le principe repose sur les vibrations entre les atomes et entre différents groupements d'une molécule lorsqu'ils sont excités par une longueur d'onde du spectre infrarouge. L'appareil permet de mesurer ces vibrations et de fournir un spectre caractéristique de la molécule (lorsqu'elle est pure) permettant d'être identifiée et d'être reconnue notamment par l'utilisation de banques de données [58].

L'analyse par FTIR de nos échantillons a été effectuée par la mise de l'échantillon considéré dans le porte échantillon et les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés dans la gamme de nombres d'onde comprise entre 4000 et 400 cm^{-1}, avec une résolution de 8 cm^{-1} et un nombre de scans égale à 20. Le spectrophotomètre utilisé est de type tensor II (Bruker) donné sur la figure (III.10).



Figure III.10 : Spectrophotomètre FTIR utilisé

III.3.2. Résultats et Discussions

III.3.2.1. Résultat du prétraitement

Le résultat du prétraitement est une poudre de couleur caractéristique des crevettes (Figure III.11). Cette poudre sera utilisée par la suite pour l'extraction de la chitine.



Figure III.11 : Poudre des déchets des crevettes

III.3.2.2. Granulométrie

La figure (III.12) illustre la répartition granulométrique en fonction du diamètre.

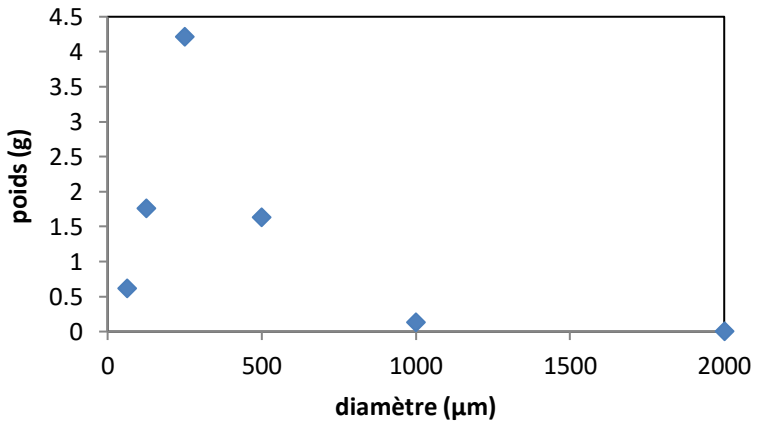


Figure III.12: Granulométrie de la poudre des déchets des crevettes

A l'essor de la figure III.12, on remarque que le pourcentage le plus élevé est obtenu sur le tamis de 250 µm. La courbe granulométrique est sous forme de cloche donc c'est une courbe gaussienne.

III.3.2.3. Déminéralisation

La figure (III.13) représente la poudre déminéralisée. Lors de l'expérience de déminéralisation, nous avons remarqué une grande quantité de mousse qui s'est produite résultante du dégagement du gaz carbonique. La quantité de la mousse produite est importante au début du contact suite à une vitesse élevée de la réaction de déminéralisation. Généralement, la réaction se termine avec la disparition du dégagement gazeux.

Selon la littérature [8], le carbonate de calcium ($CaCO_3$), principal composé minéral de déchets de crevettes (entre 30 et 50%), réagit avec l'acide chlorhydrique pour former du chlorure de calcium, de l'eau et du gaz carbonique comme décrit dans la réaction suivante (Equation III.6) [60]:

$$2\,HCl_{(aq)} + CaCO3_{(s)} \rightarrow CaCl_{2(aq)} + H_2O_{(l)} + CO_{2(g)} \qquad \text{(III.6)}$$

La plupart des autres minéraux présents réagissent de façon similaire et donnent des sels solubles en présence d'acide.

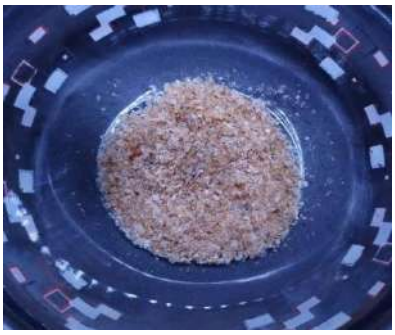


Figure III.13 : Poudre déminéralisée (MT1)

III.3.2.4. Déprotéinisation

Les protéines sont associées à la chitine par différents modes de liaisons: forces de van der Waals (~2%), liens ioniques (~3%), agglomérations stériques (~15%), liens hydrogène (~25%) et liens covalents (~55%) [60]. La figure (III.14) montre une liaison covalente entre la chitine et les protéines. La présence de liens covalents chitine-protéine demande généralement des processus de déprotéination sévères qui peuvent affecter la masse moléculaire de la chitine résultante.

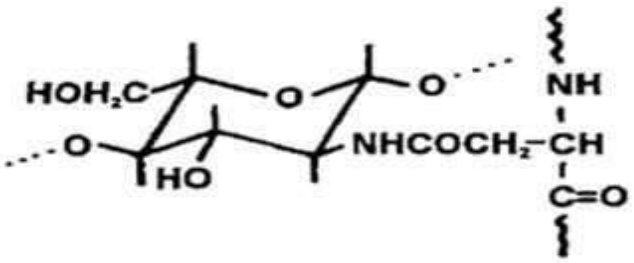


Figure III.14: Lien covalent probable dans le complexe chitine-protéine. [61]

Les produits obtenus après déprotéinisation sont sous forme de poudre de couleur clair par rapport à la couleur initiale (Figure III.15) L'évaluation de l'efficacité de la déprotéinisation de nos échantillons a été faite par analyse des spectres FTIR (voir paragraphe III.2.12) des produits obtenus (MT2). D'autres analyses ont été aussi effectués : perte en poids (voir paragraphe III.2.6), le rendement (voir paragraphe III.2.7) et ils seront discutés plus tard.



Figure III.15: Poudre déprotéinisée (MT2)

III.3.2.5. Désacétylation

La figure (III.16) montre la poudre des déchets de crevettes après désacétylation (MT3). La poudre obtenue par le chauffage classique (MT3 amb) est de couleur plus foncée que celle obtenue par chauffage par induction électromagnétique (MT3 ind).

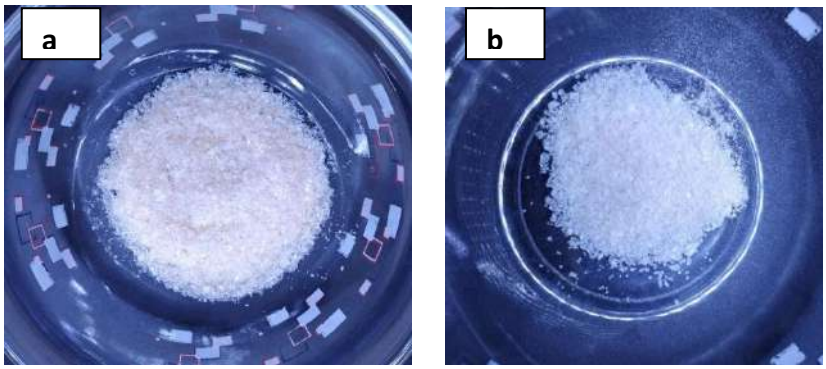


Figure III.16 : Poudre désacétylée de MT3 amb (a) et MT3 ind (b)

Cette opération avait comme objectif l'élimination des groupements acétyles liés au groupement amine des différents monomères de la chitine selon la figure (III.17). L'évaluation de l'efficacité de la désacétylation de nos échantillons a été faite par analyse des spectres FTIR (voir paragraphe III.3.2.12) et test de solubilité (voir paragraphe III.3.2.10) des produits obtenus (MT3).

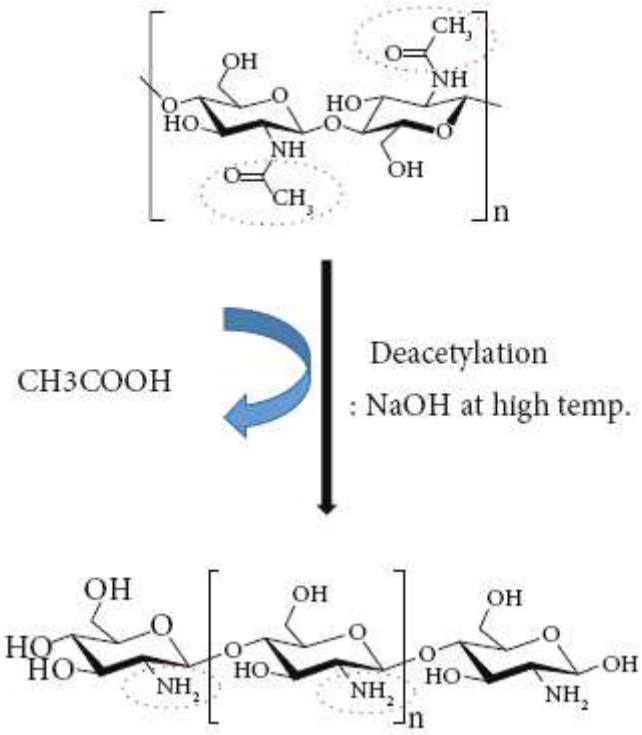


Figure III.17 : Présentation schématique de la désacétylation. [62]

III.3.2.6. Perte en poids

Les résultats de pertes en poids, après chaque étape de traitement des déchets de crevettes, sont donnés dans les figures (III.18, III.19 et III.20). Le pourcentage de perte le plus élevé est obtenu après la déminéralisation. La perte en poids nous indique l'élimination des composés non désirés : sels minéraux dans le cas de déminéralisation, protéines dans le cas de déprotéinisation et groupements acétyles dans le cas de désacétylation).

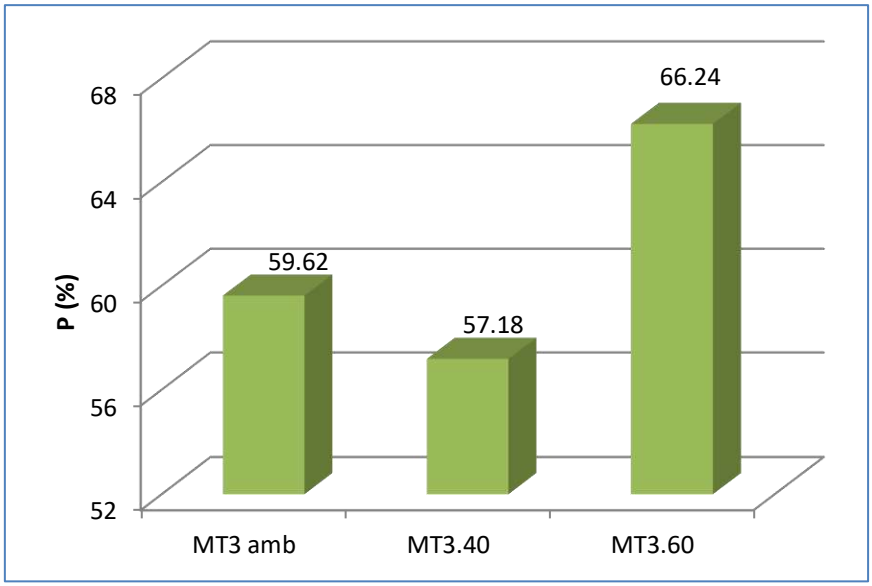


Figure III.18 : Perte de poids après déminéralisation.

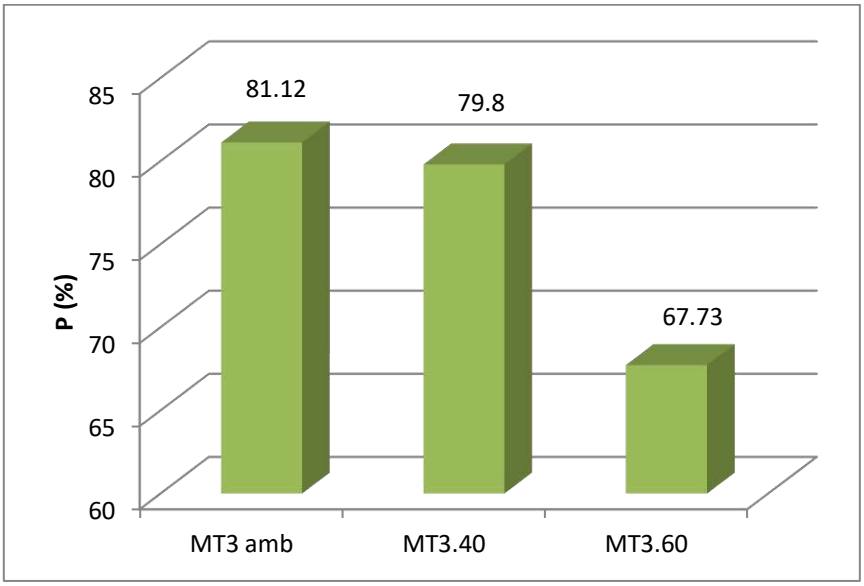


Figure III.19 : Perte de poids après déprotéinisation

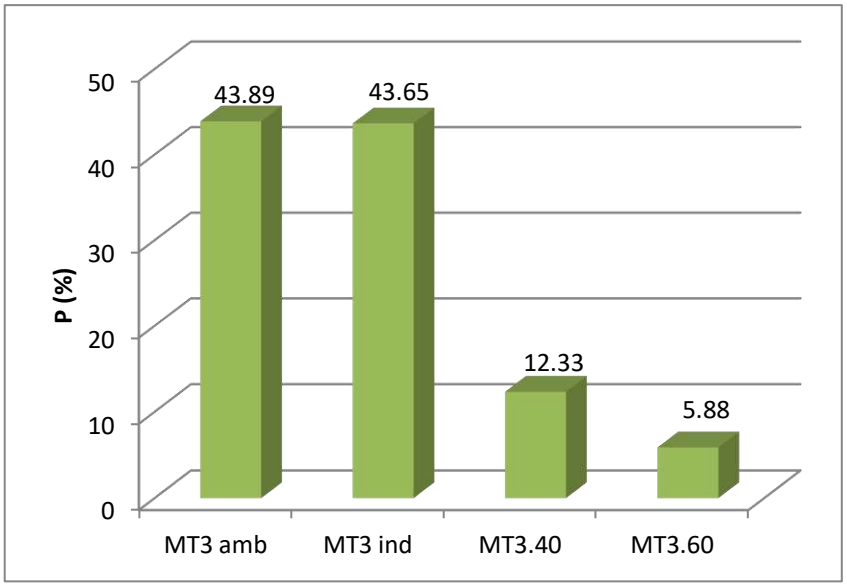


Figure III.20: Perte de poids après désacétylation.

III.3.2.7. Rendement

Les rendements en chitosane obtenus sont présentés dans la figure III.21. L'analyse de ces résultats montre un rendement faible pour les désacétylations par chauffage classique et par induction électromagnétique. Ceci dépend des conditions de traitement durant les opérations de déminéralisation et de déprotéinisation. Ces résultats sont acceptables par comparaison avec la teneur en chitine des carapaces de crevettes (13.5-17.5% (corps) et 27 % (têtes)) [20].

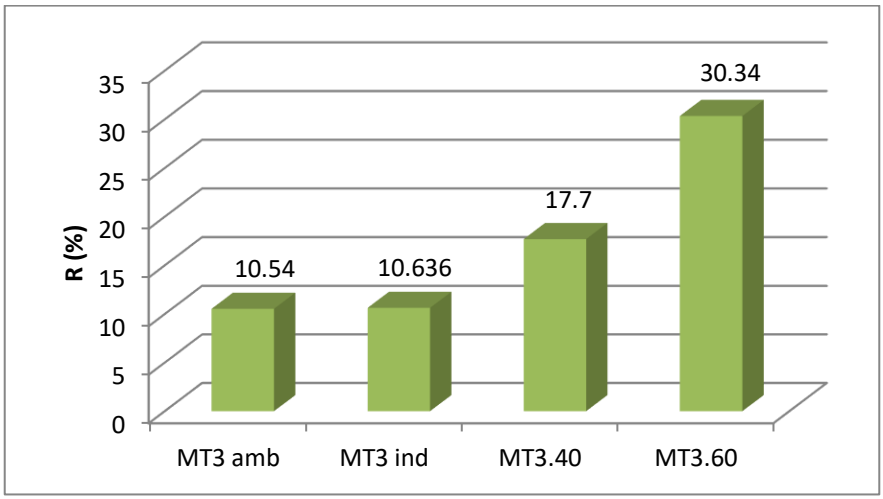


Figure III.21 : Rendement en chitosane.

III.3.2.8. Taux de cendres

Les résultats obtenus, illustrés par les histogrammes de la figure III.22, montrent que l'opération de déminéralisation a permis d'éliminer le maximum des sels minéraux. Après le premier passage de déminéralisation, le taux de cendre (2.58 %) est très faible par rapport à la teneur des déchets de crevettes en sels minéraux (25-33 %) [20]. le résultat du deuxième passage montre la déminéralisation complète des déchets.

Concernant les autres, les taux de cendres obtenus sont aussi faibles et acceptables. La déminéralisation à 60 °C a diminué d'avantage le taux de cendre.

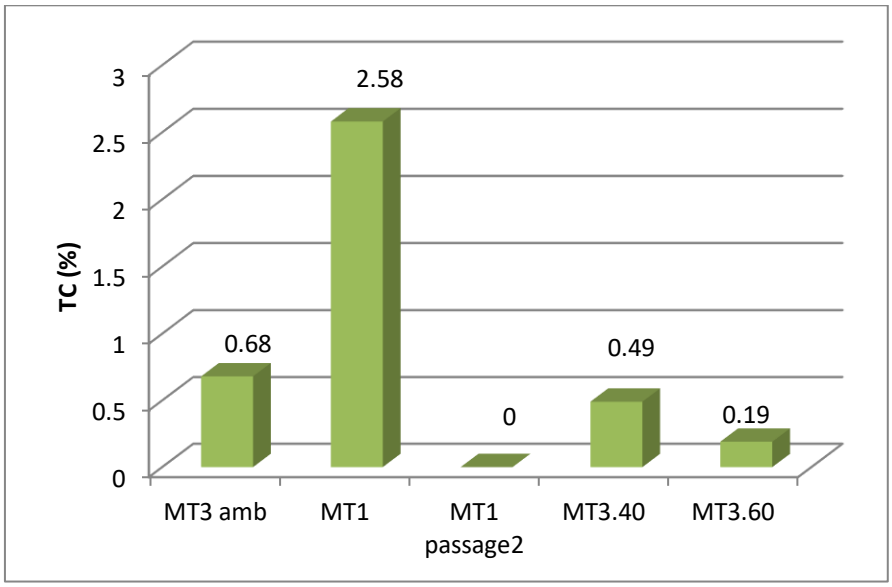


Figure III.22: Taux de cendre des échantillons après calcination.

III.3.2.9. Taux de gonflement

Le gonflement des échantillons est analysé en termes de pouvoir d'absorption de l'eau. Les résultats des taux de gonflement (Figure III.23) montrent que les échantillons (MT3 amb) et (MT3 ind) ont une affinité élevée à l'eau. L'échantillon (MT3 amb) absorbe l'eau plus de six fois de son poids alors que l'échantillon (MT3 ind) absorbe moins.

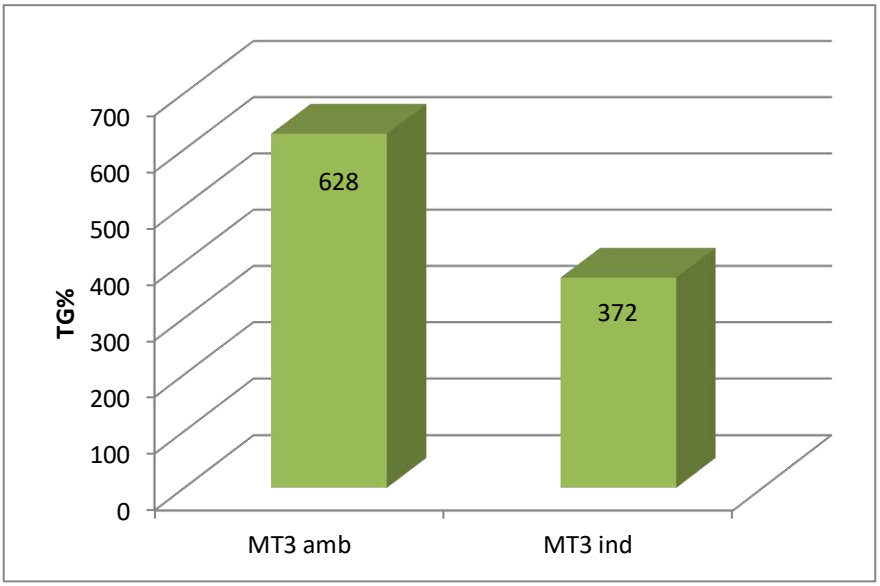


Figure III.23: Taux de gonflement de (MT3 amb) et (MT3 ind)

III.3.2.10. Test de solubilité

La figure III.24 montre que la solubilité la plus élevée (75 %) est obtenue pour l'échantillon (MT3 ind). Les faibles solubilités des autres échantillons peuvent être expliquées par le fait que le traitement de désacétylation n'a pas réussi et donc les échantillons (MT2) n'ont pas été convenablement désacétylés.

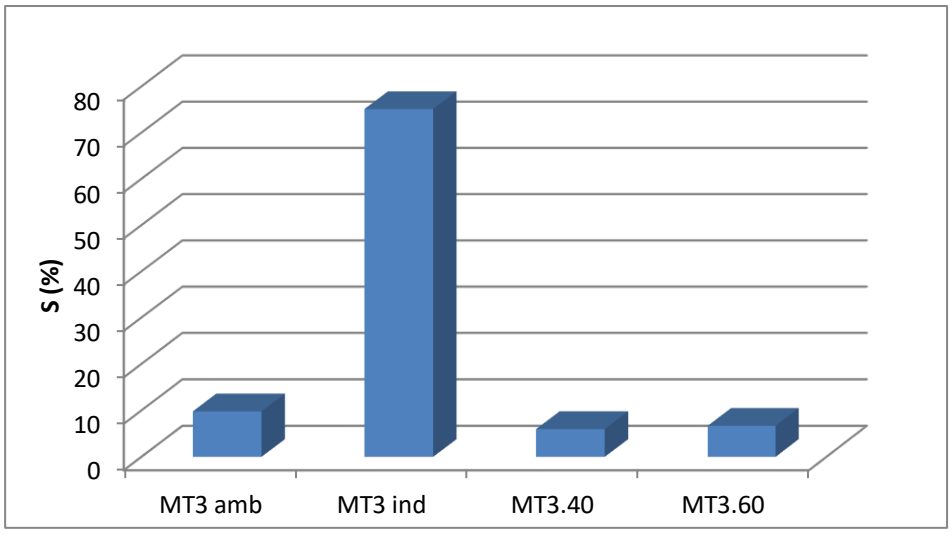


Figure III.24 : Solubilité des échantillons (MT3) obtenus par les différentes méthodes.

III.3.2.11. pH de zéro charge (pH_{pzc})

Les figures (III.25) et (III.26) montrent l'évolution du pH en fonction du volume de HCl et de NaOH ajouté pour les deux échantillons désacétylés obtenus par chauffage classique et par chauffage à induction électromagnétique.

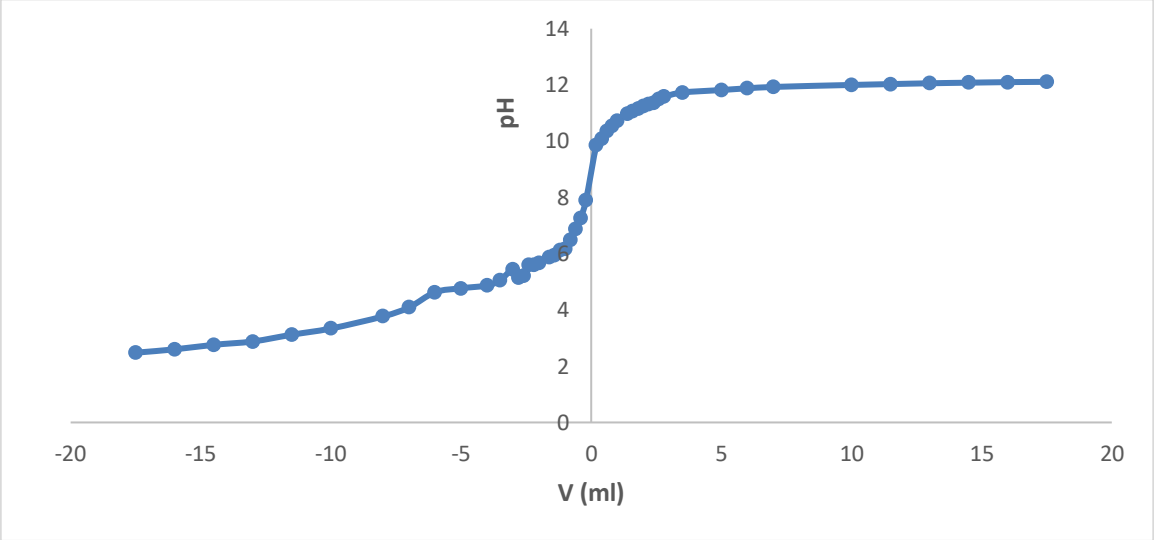


Figure III.25 : Evolution du pH en fonction du volume de HCL (à gauche de l'axe des pH) et NaOH (à droite de l'axe des pH) pour l'échantillon (MT3 ind)

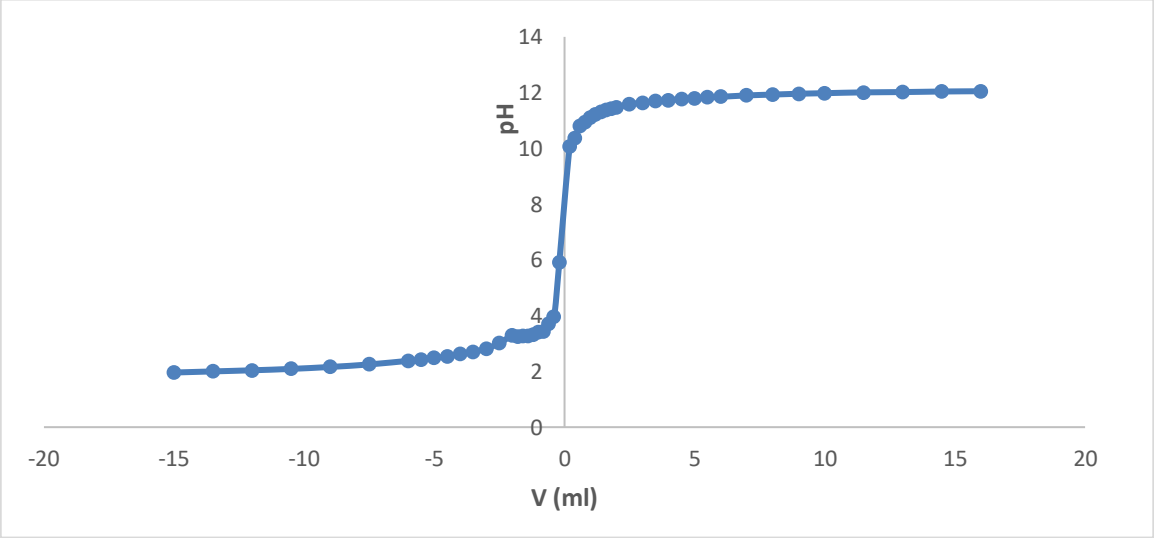


Figure III.26 : Evolution du pH en fonction du volume de HCL (à gauche de l'axe des pH) et NaOH (à droite de l'axe des pH) pour l'échantillon (MT3 amb).

Les valeurs de pH_{pzc} obtenus sont de l'ordre de 8 pour l'échantillon (MT3 amb) et 9 pour l'échantillon (MT3 ind). Ces deux valeurs sont plus élevées par rapport au pH_{pzc} du chitosane rapporté dans la littérature [59] qui est de l'ordre de 6.3.

III.3.2.12. Résultats FTIR

Les spectres FTIR des échantillons Non traité (MNT), déminéralisé (MT1 amb) et déprotéinisé (MT2 amb) à température ambiante sont illustrés par la figure (III.27).

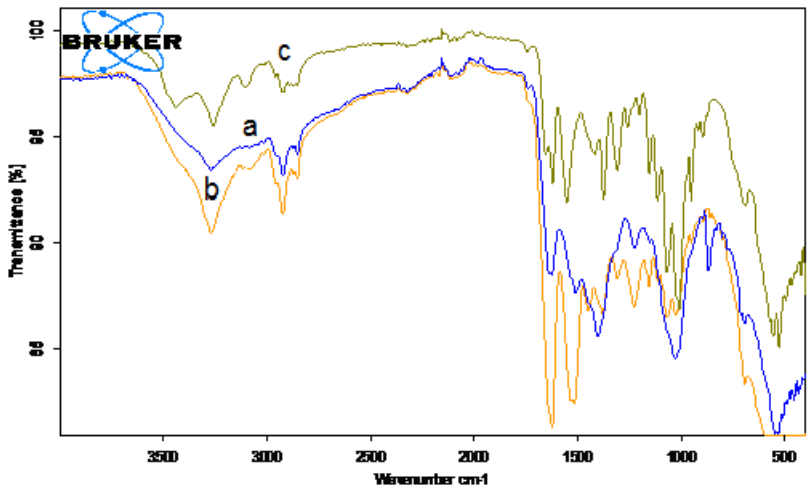


Figure III.27: Spectres FTIR des échantillons : MNT (a), MT1 amb (b) et MT2 amb (c)

L'analyse des spectres nous a permis de déduire que la poudre des déchets des crevettes (MNT) contient :

- des groupements hydroxyles : liaison C-O des alcools primaires et secondaires (1029 et 1403 cm^{-1}) et liaison O-H (3200 cm^{-1})
- des groupements amines : liaison C-N (1226 cm^{-1}) et liaison N-H (3200 cm^{-1})
- des groupements amides : liaison C=O (1632 cm^{-1})
- des groupements carbonates : liaison C-O (867 cm^{-1})
- des groupements CH_3 et CH_2 : liaison C-H (≈2800 cm^{-1}et ≈1380 cm^{-1})

Après déminéralisation (MT1), nous remarquons la disparition du pic caractéristique des carbonates et que le pic caractéristique des amides a généré deux pics distincts ceci est du à l'élimination des carbonates de calcium et autres sels minéraux. Ce résultat confirme les résultats de perte en poids, rendement et taux de cendre discutés précédemment.

Après déprotéinisation (MT2), nous avons remarqué que l'empreinte des amides (1650-1500 cm^{-1}) est devenue mieux définie suite à la déprotéinisation.

Après désacétylation, nous remarquons que le spectre de l'échantillon (MT3 amb) est superposable à celui de l'échantillon (MT2 amb) (Figure III.28). Ce résultat indique que la désacétylation n'est pas réussi et il est en bon accord avec le résultat de solubilité discuté précédemment.

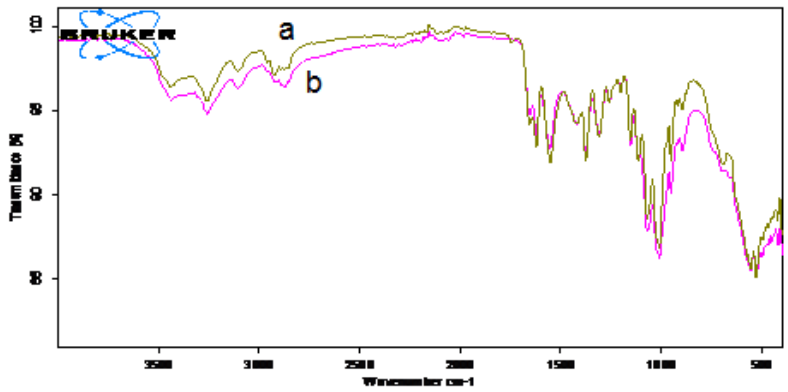


Figure III.28: Spectres FTIR de MT2 amb (a) et MT3 amb (b)

Effet de la température sur la déminéralisation

L'augmentation de la température durant l'opération de déminéralisation, n'a pas une grande influence. Les différents spectres de la figure (III.29) présentent les mêmes pics. Nous remarquons toujours la disparition du pic caractéristique des carbonates du à l'élimination des carbonates de calcium et autres sels minéraux.

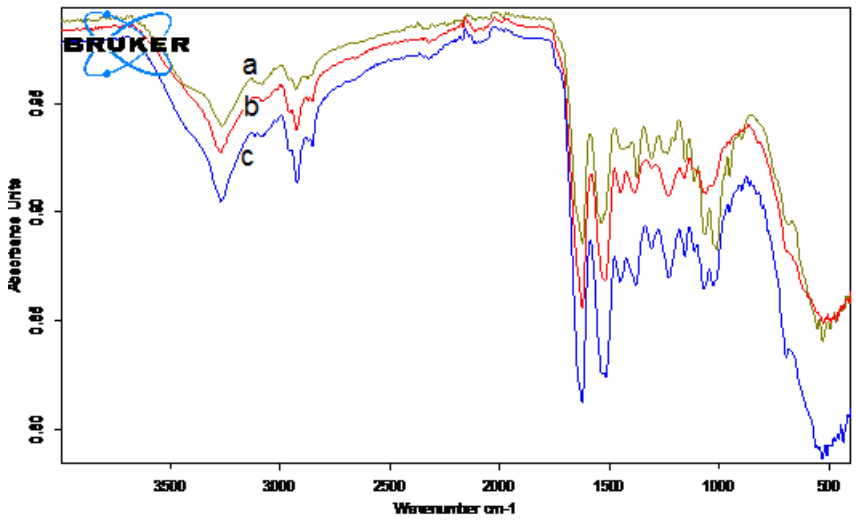


Figure III.29 : Spectres FTIR de MT1 60 (a), MT1 40 (b) et MT1 amb (c)

Effet de la température sur la déprotéinisation

Dans ce cas (Figure III.30), nous remarquons la modification des pics caractéristiques des amides à une température de 40 °C ce qui indique l'élimination des protéines porteurs de ces groupements fonctionnels.

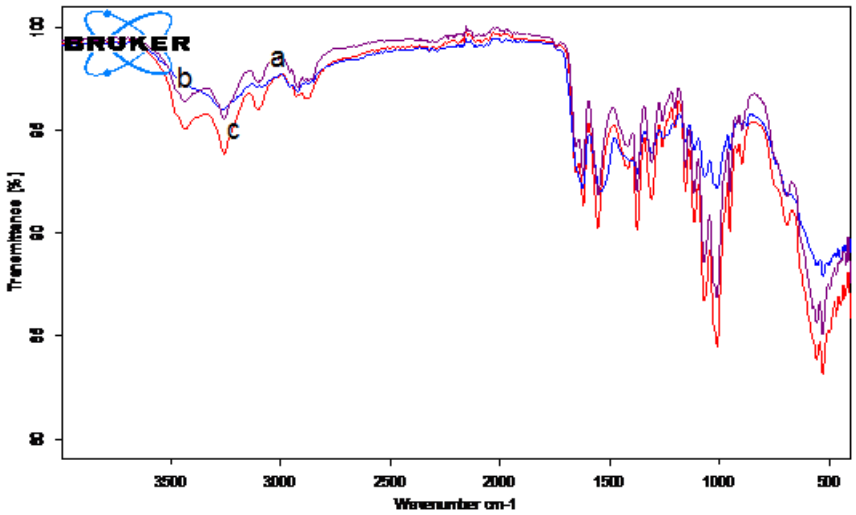


Figure III.30 : Spectres FTIR de MT2 amb (a), MT2 40 (b) et MT2 60 (c)

Effet de la température sur la désacétylation

Les spectres des échantillons (MT3 amb), (MT3 40) et (MT3 60) présentent les mêmes pics. De plus Il est à noter que les pics deviennent plus intense après traitement à 40 °C et 60 °C (Figure III.31).

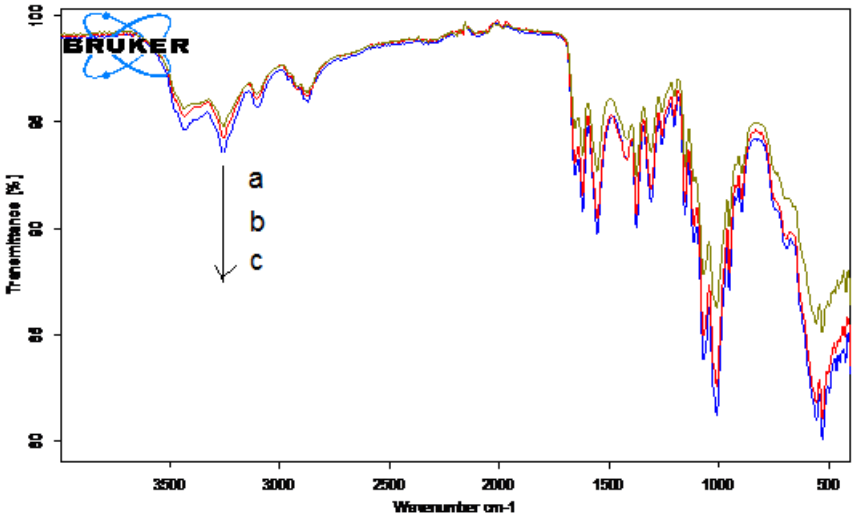


Figure III.31 : Spectres FTIR de MT3 amb (a), MT3 40 (b) et MT3 60 (c)

Effet du mode de chauffage sur la désacétylation

Les spectres FTIR obtenus sur les échantillons (MT3 amb) et (MT3 ind) sont représentés sur la figure (III.32). Nous remarquons la disparition quasi-totale du pic ≈1632 cm-1 et la diminution de l'intensité du pic ≈ 1520 cm-1 ce qui montre l'avantage de la désacétylation en utilisant le chauffage par induction électromagnétique.

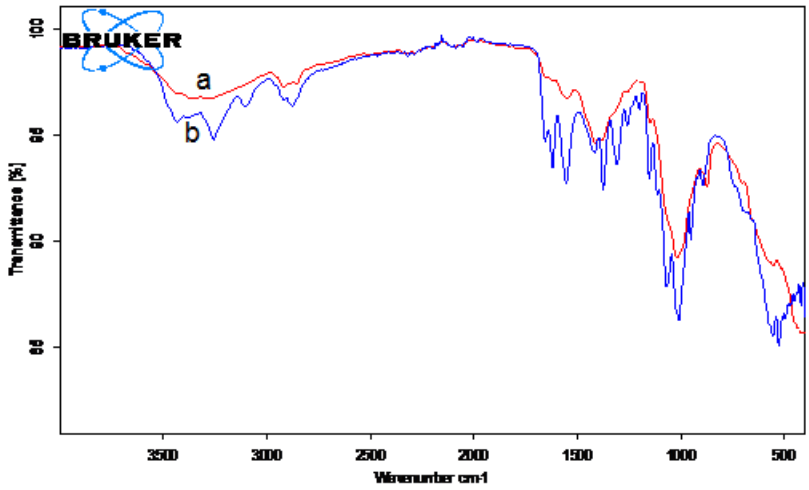


Figure III.32: Spectre FTIR de MT3 ind (a) et MT3 amb (b)

Le tableau (III.6) montre une comparaison de l'attribution des pics d'absorption des différents échantillons (MT3).

Tableau III.6: Attribution des pics d'absorption des échantillons désacétylés

Chitosane commercial	MT3 ind sol	MT3 ind	MT3 amb	
Pics d'absorption (cm^{-1})				Attribution
3100-3200	3250-3400	3200-3400	3450,3250 et 3100	**O-H et N-H**
2890 et 2850	2884	2800-2900	2890	**C-H (CH_3)**
1680	1621	/	1655, 1620	**C=O (amide)**
1550	1520	1548	1554	**C=O (amide)**
1350-1490	1418, 1377 et 1312	1414, 1380	1416, 1376, 1309	**C-H (CH_3)** **C-O (alcool)**
1000-1050	1000-1100	1000-1050	1000-1050	**C-O (alcool)** **C-N (amine)** **C-O-C (cycle)**

III.4. Application à l'adsorption des colorants

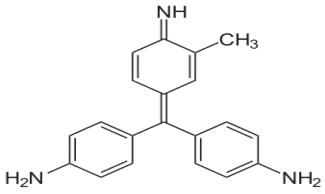
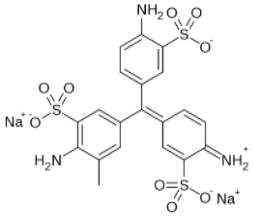
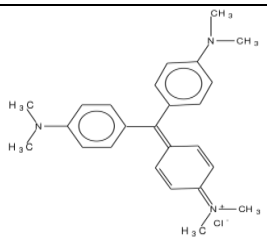
L'objectif de cette partie est de trouver une application aux biopolymères obtenus. De ce fait, nous avons choisi une application environnementale par biosorption de quelques colorants. Cette étude préliminaire a été effectuée sur les échantillons (MT1 amb), (MT3 amb) et (MT3 ind).

- **La fuchsine basique** est un colorant triaminotriphénylméthane de formule moléculaire **$C_{20}H_{20}N_3$**. C'est un mélange de trois colorants Para rosaniline, Rosaniline et Magenta II et donc connu sous le nom de Magenta II.C'est un de ces rares colorants inflammables ; Ce produit intervient dans la coloration de Gram, mais aussi dans les milieux de culture bactériens [63].
- **La fuchsine acide** est incolore. En effet, elle est des **leucodérivés** (c'est-à-dire des dérivés blancs) de la fuchsine basique obtenues par réaction avec cette dernière et de l'oxyde de soufre. Elle prend une coloration rose en cas de réduction [63].
- **Le violet de gentiane** est un colorant de couleur violette, d'autant plus foncée que le nombre de groupements méthyle augmente, utilisé surtout en microbiologie dans la

coloration des gram et dans certains milieux sélectifs (par exemple, dans la gélose de Drigalski comme inhibiteur des bactéries à Gram positif) [64].

Le **tableau (III.7)** récapitule l'ensemble des propriétés physico-chimiques de ces colorants

Tableau (III.7): Caractéristiques physico-chimiques de fuchsine basique, fuchsine acide et violet gentiane.

	fuchsine basique	**fuchsine acide**	**Violet de gentiane**
Formule brute	$C_{20}H_{20}N_3 \cdot HCl$	$C_{20}H_{17}N_3Na_2O_9S_3$	$C_{25}H_{30}ClN_3$
Structure chimique			
Masse molaire	337,86 g/mol	585.54 g/mol	407,979 g/mol
λ_{Max}	549-552 nm	544-548nm	587-590nm
Apparence	Solide vert sombre	Poudre vert foncé	Poudre verte
Solubilité dans l'eau	2650 mg·L^{-1} d'eau à 25 °C	2 650 mg·L^{-1} d'eau à 25 °C	4 g·L^{-1} d'eau à 25 °C

III.4.1. Mode opératoire

III.4.1.1. Etablissement de la courbe d'étalonnage

a. **Préparation des solutions :** Des solutions mères de concentration 20 mg/L en violet de gentiane, fuchsine basique et fuchsine acide ont été préparée. Puis à partir de ces solutions, des solutions filles de concentration connues ont été préparées par dilution.

b. Analyse par spectrophotomètre UV/Visible : La densité optique des solutions filles a été déterminée par spectrophotométrie UV/Visible aux longueurs d'ondes suivantes : 548 nm, 549 nm et 549 nm pour violet de gentiane, fuchsine basique et fuchsine acide respectivement.

Il est à noter que le spectrophotomètre utilisé est de modèle « UVmini-1240 » de la marque Shimadzu (Figure III.33).



Figure III.33 : Spectrophotomètre SHIMADZU, UV mini-1240

III.4.1.2. Cinétique de biosorption

Les échantillons (MT1 amb), (MT3 amb) et (MT3 ind) de masse connue (0.1 g) ont été immergés dans 50 ml de solution de concentration 20 mg/L en colorant. Le mélange est maintenu sous agitation faible et les densités optiques des solutions ont été mesurées à des intervalles de temps réguliers en utilisant le spectrophotomètre UV/Visible à la longueur d'onde maximale de chaque colorant.

La concentration des colorants a été déterminée en utilisant la loi de Beer-Lambert :

$$\mathbf{A} = Log\frac{I_0}{I} = \varepsilon CL \qquad \text{(III.7)}$$

Avec:

A : Absorbance.

ε : Coefficient d'extinction spécifique du soluté.

L : Epaisseur de la cellule optique.

C : La concentration du soluté.

$\mathbf{I_0}$: L'intensité de l'énergie d'irradiation arrivant sur l'échantillon (Lumière incidente).

I : L'intensité de la radiation qui a traversé l'échantillon (Lumière transmise).

L'efficacité de décoloration **R(%)** est donnée par la relation suivante :

$$\mathbf{R}(\%) = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \qquad \text{(III.8)}$$

Avec:

C_0 : La concentration initiale de la solution.

C : La concentration finale de la solution.

R : le rendement de décoloration.

III.4.2. Résultats et discussions

III.4.2.1. Courbe d'étalonnage

Les résultats de la courbe d'étalonnage de chaque colorant sont représentés dans les figures (III.34), (III.35) et (III.36).

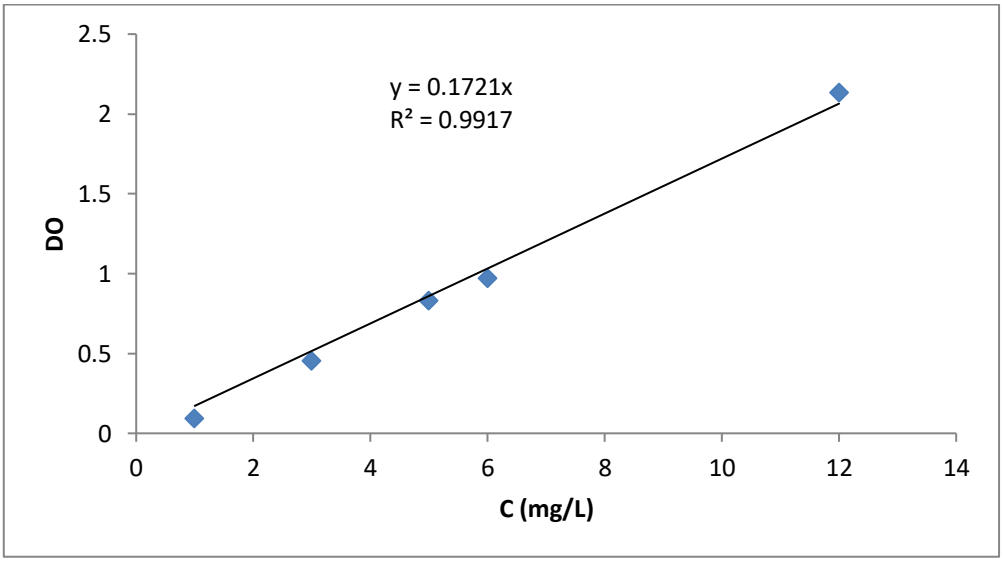


Figure III.34 : Courbe d'étalonnage du violet de gentiane

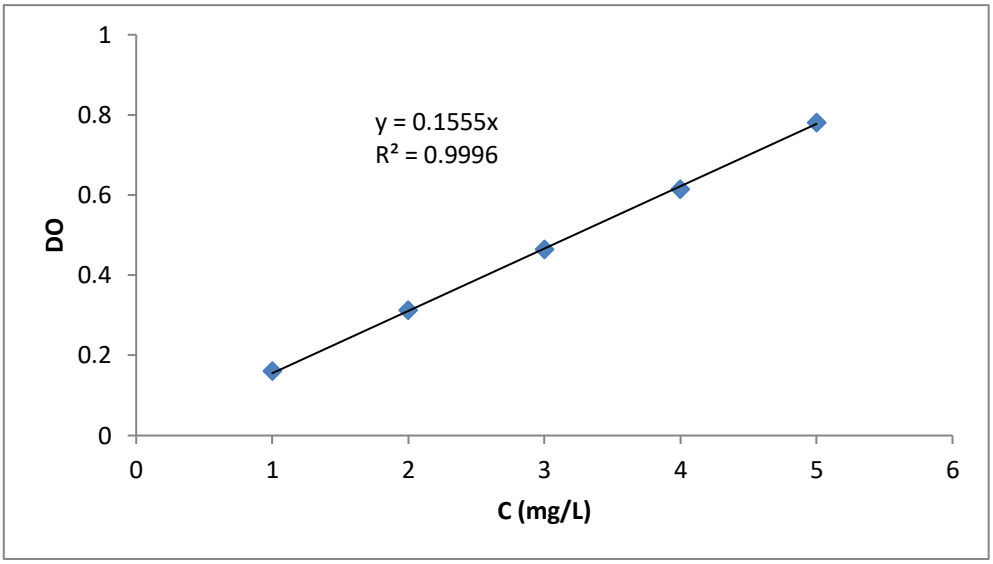


Figure III.35: Courbe d'étalonnage de fuchsine basique

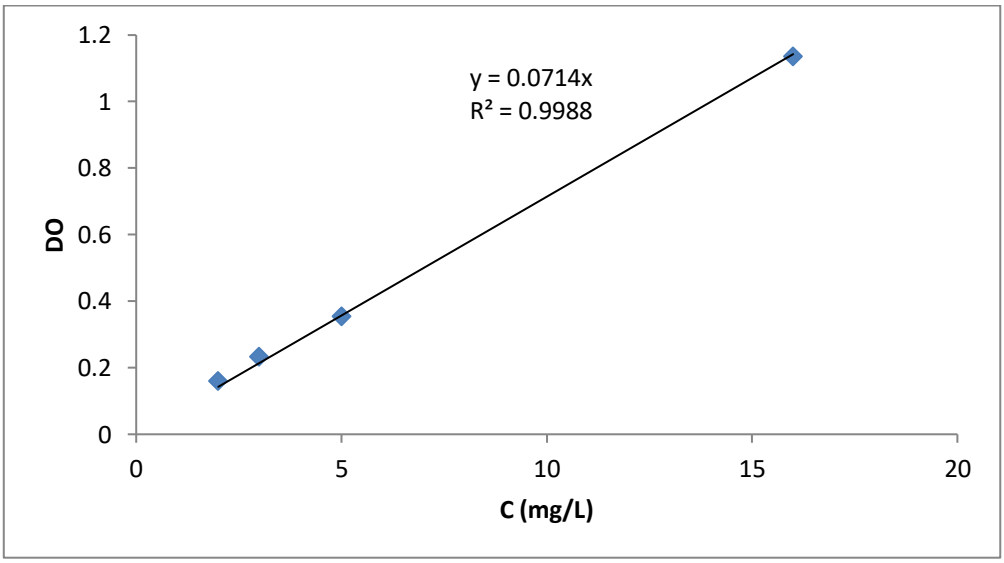


Figure III.36: Courbe d'étalonnage de fuchsine acide

III.4.2.2. Biosorption

Les résultats de la biosorption de chaque colorant par les différents échantillons biosorbats sont représentés dans les figures (III.37), (III.38) et (III.39). L'analyse de ces résultats montre que le rendement de la décoloration des solutions colorées augmente en fonction du temps pour les trois colorants. L'atteinte de l'équilibre est variable en fonction de la nature du colorant et de la nature du biosorbat. Nous remarquons que la fuchsine basique et le violet de gentiane ont une affinité aux déchets de crevettes déminéralisés

(MT1 amb) avec des taux de décoloration de 85 % et 87 % respectivement. Au contraire, la fuchsine acide à une affinité avec les échantillons désacétylés (MT3 ind) et (MT3 amb) avec des taux de décoloration de 80 % et 86 % respectivement.

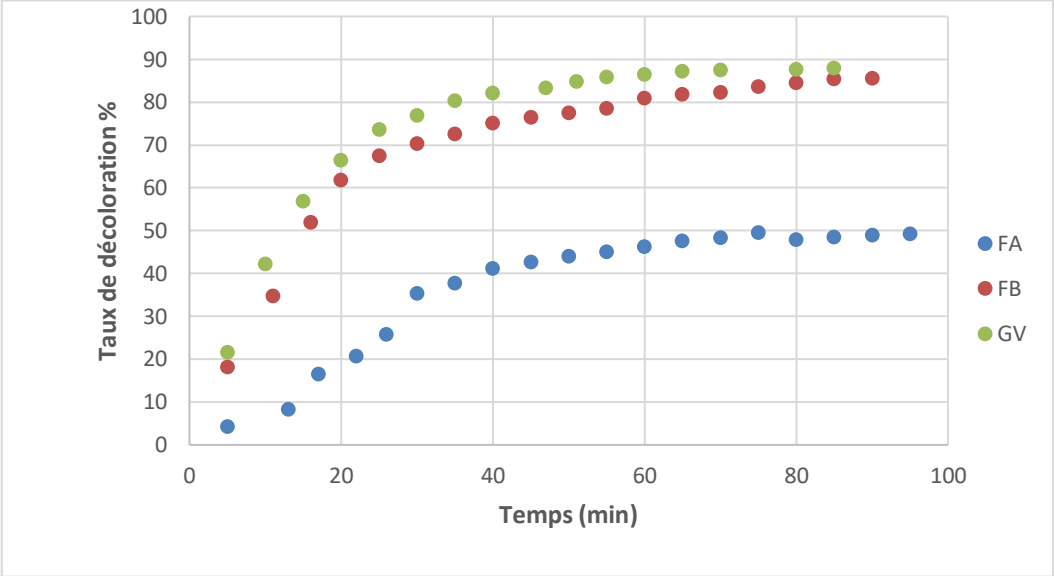


Figure III.37 : Cinétique de biosorption des colorants sur l'échantillon (MT1 amb)

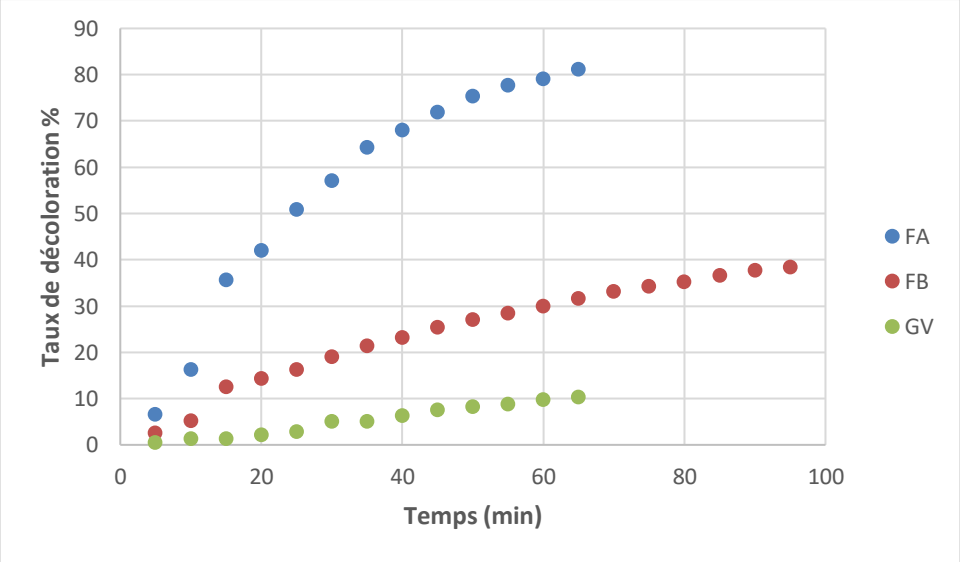


Figure III.38 : Cinétique de biosorption des colorants sur l'échantillon (MT3 ind)

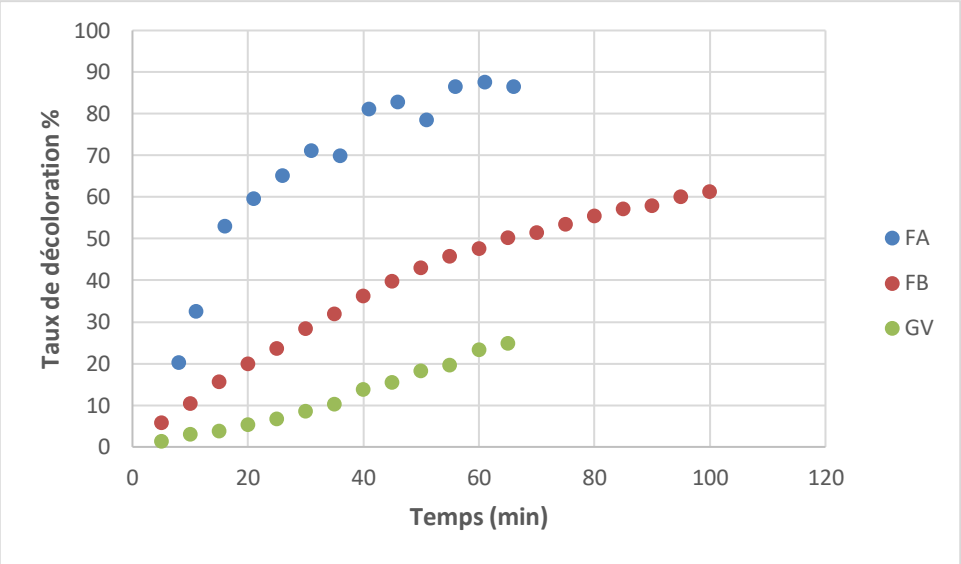


Figure III.39 : Cinétique de biosorption des colorants sur l'échantillon (MT3 amb)

Conclusion générale

L'objectif principal de ce travail était la valorisation des déchets de crevettes par extraction des deux biopolymères chitine et chitosane en vue d'une application dans le domaine pharmaceutique et/ou environnemental. Les produits obtenus durant les étapes d'extraction ont été caractérisés et leurs propriétés physico-chimiques ont été déterminées.

L'extraction

Pour ce faire, la première partie de cette étude a été consacré à l'extraction et la caractérisation des produits obtenus:

- L'extraction a été effectuée en trois étapes : déminéralisation, déprotéinisation et désacétylation. Les deux premières étapes ont été effectuées à trois températures (ambiante, 40 °C et 60 °C). La dernière étape nécessite un chauffage à 140 °C, donc deux modes de chauffages ont été envisagés : chauffage classique et chauffage par induction électromagnétique.
- Les résultats de perte en poids durant l'extraction montrent que le pourcentage de perte le plus élevé est obtenu après la déminéralisation. Le calcul du rendement en chitosane à donné des valeurs acceptables par comparaison avec la littérature. Le taux de cendre obtenu après déminéralisation (2.58 %) est très faible par rapport à la teneur des déchets de crevettes en sels minéraux (25-33 %).
- Le test de gonflement a montré que l'échantillon (MT3 amb) absorbe l'eau plus de six fois de son poids alors que l'échantillon (MT3 ind) absorbe moins. Le test de solubilité a montré que la solubilité la plus élevée (75 %) est obtenue pour l'échantillon (MT3 ind).
- Les valeurs de pH_{pzc} obtenus sont de l'ordre de 8 pour l'échantillon (MT3) et 9 pour l'échantillon (MT3 ind). Ces deux valeurs sont plus élevées par rapport au pH_{pzc} du chitosane rapporté dans la littérature (6.3).
- L'analyse par FTIR des déchets de crevettes a montré la présence des groupements caractéristiques notamment les groupements hydroxyles, amines, amides et carbonates. Après déminéralisation, le pic des carbonates a disparu. Après désacétylation par chauffage classique, les résultats ont montré que le spectre de l'échantillon (MT3 amb) est superposable à celui de l'échantillon (MT2 amb). Ceci indique que la désacétylation n'est pas réussi.
- L'augmentation de température n'a pas d'effet sur la déminéralisation. Par contre, une température de 40 °C a modifié les pics caractéristiques des amides.

- Le mode de chauffage par induction électromagnétique avait une influence remarquable sur la désacétylation par disparition quasi-totale du pic ≈1632 cm-1 et la diminution de l'intensité du pic ≈ 1520 cm-1 ce qui montre l'avantage de la désacétylation en utilisant ce mode de chauffage.

Pour la deuxième partie de cette étude, une étude préliminaire de biosorption de quelques colorants (fuchsine basique, fuchsine acide et violet de gentiane) en utilisant les échantillons (MT1 amb), (MT3 amb) et (MT3 ind) a été réalisée. Les résultats ont montré que :

- le rendement de décoloration augmente en fonction du temps pour les trois colorants.
- l'atteinte de l'équilibre est variable en fonction de la nature du colorant et de la nature du biosorbat.
- la fuchsine basique et le violet de gentiane ont une affinité aux déchets de crevettes déminéralisés (MT1 amb) avec des taux de décoloration de 85 % et 87 % respectivement.
- la fuchsine acide à une affinité aux échantillons désacétylés (MT3 ind) et (MT3 amb) avec des taux de décoloration de 80 % et 86 % respectivement.

Enfin, et comme perspectives, nous proposons de poursuivre cette étude en :

- Etudiant profondément la désacétylation en utilisant le mode de chauffage par induction électromagnétique
- Envisageant une application pharmaceutique

Références bibliographiques

[1]: N. Jarroux, Techniques de l'ingénieur. Plastiques et composites, vol. AM4, noAM3580. , 3122. 2011

[2]: N. Mokrani, « Préparation et Etude du Comportement de Membranes Biopolyméres Alginate de Sodium/Chitosane », Mémoire de Magister, Université M'hamed bougara boumerdes, 2013.

[3]: J. Wallach, « Biochimie generale (seventh edition): By J H Weil. pp 576. Masson, Paris.1994. (In French) ISBN 2-225-8416-9 », Biochemical Education, vol. 23, no 1, p. 48, 1995.

[4]: D. Eymery, « Biochimie descriptive et métabolique », Sainte-Foy: Le Griffon d'argile. 1987.

[5]: M. N. Ravi Kumar, « A review of chitin and chitosan applications », Reactive andFunctional Polymers, vol. 46, N° 1, p. 1-27, 2000.

[6]: W. Paul et C. P. scharma, « chitosan à drug carrier for the 21st century: a review ». ST.P. Pharm. Sci, p. 10 (1) 5-22, 2000.

[7]: L.BOUZIDI ; S.CHANOUNE, « Elaboration et Caractérisation d'un CompositeTotalement Biodégradable », Université A. MIRA – BEJAIA, 2017.

[8]: https://www.google.com/search?q=biopolymeresorganigramme (consulté le 18/03/2019).

[9]: Gregorio Crini;Pierre-Marie Badot et EricGuibal. « Chitine et chitosane du biopolymère a l'application ».Université de Franch Comte.2009.

[10]: Shahidi F ;Abuzaytoun R. « Chitin ,chitosane and co-products :chemistry,production, applications and health effects ».Adv. Foonutr.Res, 49.93-135. 2005.

[11]: Randrianasolo O. V. Contribution aux études sur la préparation du chitosane àpartir des carapaces de crevettes, mémoire d'ingéniorat, ESPA, p6-34. 2003.

[12]: Le Devedec F. Séparation des oligomères du chitosane par chromatographied'affinité sur ions métalliques immobilisés, mémoire de master, Université duQuebec à Montréal, p5-21. 2008.

[13]: Mourad F. Co-adsorption des métaux lourds sur la bentonite modifiée enprésence de floculants minéral et biologique, mémoire de Magister, UniversitéMouloud Mammeri Tizi-Ouzou, p 13, 34-42. 2012.

[14]: Crini G. et al. Chitine et chitosane du biopolymère à l'application, Presses universitaires de Franche- Comté, p2-9, 2009.

[15]: Durand V. Et Vergini T. Le chitosaneun biopolymère d'avenir pour lespapiers antimicrobiens? Cas des emballages alimentaires, CERIG, Grenoble PagoraINPRinaudo M., 2006,Chitine et Chitosane, CERMAV-CNRS, Centre de recherches surles macromolécules végétales. 2010.

[16]: Pominville-RacetteMathie. « La transformation de carapaces de crevettes en chitosane université de Sherborooke. 2015.

[17]: Martin Poirier. «Fractionnement et caractérisation de la chitine dans le système N,N-dimethylacetamide/chlorure de lithuim ». Université de Laval. 2000.

[19]: A. C. M. Wu, W. A. Bough, M. R. Holmes, et B. E. Perkins, « Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. III. Coagulation of cheese whey solids », Biotechnology and Bioengineering, vol. 20, no 12, p. 1957-1966, 1978.

[20]: Djelad Amel. «Préparation des matériaux composites chitosane–zeolithes. Application dans l'adsorption du cuivre ». Thèse de doctorat. Université d'Oran. 2011.

[21]: Kurita K. «Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans »Marine Biotechnol. 8, 2006. 203.

[22]: L. Payet, F. ponton ;P . Agenly,J.colinart; L.Grpossiord.payet et al ; Rhéologie Caractérisation rhéologique de la gélification de l'alginate et de chitosane : effet de la température Vol.2 ,2002.46-51.

[23]: Chachou Fatima. «synthèse de la magadite et des composites magaditepolysaccharides–Tests antibactériens ».Thèse de Magister. Université d'Oran. 2014.

[24]: Benali Ahmed. «préparation des composites Argile-chitosane, application à la rétention des colorants ».Thèse de Magister. Université de Tlemcen. 2013.

[25]: NWE, N. and W.F. STEVENS, chitosane by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction. Biotechnoly Letter, 24: p. 2002. 131-134.

[26]: Mecheddou.c et Barr.k . «Valorisation des carapaces des crevettes dans la dépollution des eaux : Extraction du chitosane et optimisation des procédés». memoire de fin d'etudes en vue de l'obtention du diplome master, universite akli mohand oulhadj-bouira- , septembre 2018.

[27]: Aranaz l., Harris R et Heras A. chitosan amphiphilic derivates chemistry and applications.Current Organic Chemistry. 14:308-330. 2010.

[28]: ROBERTS;G.A.F, Chitin chemistry, in Macmillian Press. Houndmills, UK. 1992

[29]: Zemmouri H. Utilisation du chitosane comme agent floculant dans le traitement des eaux. Mémoire de Magister, Laboratoire de Biotechnologie Environnementale et Géniedes procédés, Ecole Nationale polytechnique, Alger, Algérie.2008.

[30]: PA. Sandford. Chitosan: commercial uses and potentials in: sources; chemistry; biochemistry; physical properties and appliG;AnthonsenT;SandfordPA; eds. London New York: Elsevier.1989.

[31]: Muzzarelli RAA, Jeuniaux C, Gooday GW. Chitin in Nature and Technology. New York: PlenumPublishing Corporation (1986).

[32]: Ben Dhieb Fatima. «développement et caractérisation de films biodégradables a base d'acide poly lactique et de chitosane ».Université de Laval. 2014.

[33]: I.-Y. Kim et al., « Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications», Biotechnol. Adv., vol. 26, N° 1, p. 1-21, 2008.

[34]: S. Chen, M. Liu, S. Jin, et B. Wang, « Preparation of ionic-crosslinked chitosan-based gel beads and effect of reaction conditions on drug release behaviors », International Journalof Pharmaceutics, vol. 349, N° 1-2, p. 180-187, 2008.

[35]: S. Şenel et S. J. McClure, Potential applications of chitosan in veterinary medicine , Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 56, N° 10, p. 1467-1480, 2004.

[36]: K. Nishimura, S. Nishimura, N. Nishi, I. Saiki, S. Tokura, et I. Azuma, « Immunological activity of chitin and its derivatives », Vaccine, vol. 2, N° 1, p. 93-99, 1984.

[37]: P. K. Dutta, M. N. V. Ravikumar, et J. Dutta, « Chitin and Chitosan for VersatileApplications », Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews, vol. 42, no3, p. 307-354, 2002.

[38]: E. Guibal, « Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: A review,Separation and Purification Technology, vol. 38, N° 1, p. 43-74, 2004.

[39]: Le Roux K. Purification de chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevettes PenaeusVannamei. Caractérisation des produits et optimisation du procédé, thèse de doctorat, Université de Nantes, p28-47, 2012.

[40]: H. K. No et S. P. Meyers, « Preparation and characterization of chitin and chitosan - Areview. », Journal of Aquatic Food Product Technology, vol. 4, no 2, p. 27-52, 1995.

[41]: B. Dhieb, Développement et caractérisation de films biodégradables à base d'acide polylactique et de chitosane », Mémoire, Université LAVAL. Canada, 2014.

[42]: C. J. Brine et P. R. Austin, « Chitin variability with species and method of preparation »,Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and, vol. 69, no 2, p.283-286, 1981.

[43] : L. Payet et L. P. Visco, « Viscoélasticité et structure de gels a base de chitosane - Relations avec les propriétés diffusionnelles de macromoléecules dans ces biogels »,Thése de Doctorat, Universite Paris 7, 2005.

[44]: N. Nwe, T. Furuike, et H. Tamura, Isolation and characterization of chitin and chitosan from marine origin, 1re éd., vol. 72. Elsevier Inc., 2014.

[45]: Ke Liang B Chang Gengia Tsai,John Lee Wen- Rong F: Heterogeneous N-deacetyation of chitin in alkaline solution. carbohydrate Researh 303 (1997) 327-332.

[46]: Sayan Kaewboonruang ,Comparative Studies On The Extraction Of Chitinchitosan From Golden Apple Snail Shells At The Control Field, A Dissertation Submitted In Partial Fulfillment Of The Requirements For The Doctor Degree Of Philosophy In Environmental Science Copyright Of Burapha ,University Faculty Of Science Burapha University, June 2016.

[47]: Dutrow, B. L. et Clark, C. M. Diffraction des rayons X sur poudre (XRD). 2012 Récupéré sur http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRD.html

[48]: Cullity, B. Éléments de diffraction des rayons X. Messe: Addison-Wesley. 1978.

[49]: Bish, D. L. Diffraction de poudre moderne. Amérique: Mineralogical Society. 1989.

[50]: Sagheer, Al., Al-Sughayer, F. A., Muslim, M. A., et Elsabee, M. Z. Extraction et caractérisation de la chitine et du chitosane de sources marines en arabe Golfe. Polymères glucidiques, 77 (2), 410-419, 2009.

[51]: Griffiths, P. et de Hasseth, J. A. Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier.Blackwell, Wiley. 2007.

[52]: Peter, M. G. Applications et aspects environnementaux de la chitine et du chitosane.Journal of Macromolecular Science, Partie A: Chimie pure et appliquée, 2 (4), 629-640, 1995.

[53]: Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., et Yang, Q. Extraction et caractérisation de la chitine du coléoptère Holotrichiaparallelamotschulsky. Molecules, 17 (4), 4604-4611, 2012,

[54]: Pawlak, A. et Mucha, M. Études thermogravimétriques et FTIR du chitosane mélanges. Thermochimica acta, 396 (1), 153-166, 2003.

[55] https://fr.m.wikipedia.org/wiki/résonance_magnétique_nucléaire (consulté le 07/07/2021).

[56]: Nguyen Dang Khoa VO, Synthèse de nanoparticules d'or par irradiation de solution aqueuse d'ions Au(III) en présence de chitosane, Thèse de Doctorat, Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE. 2013.

[57]: Troung,T; Hausher,F; Monette,F ; Niquette,P. « Valorisation des residusindustriels de pèches pour la transformation de chitosane par technique hydro thermo chimique ». Revue de science de l'eau. Université du Québec. 2007.

[58]:Pominville-Racette Mathie. « La transformation de carapaces de crevettes en chitosane »Rapport intermédiaire-groupe 1A. Université de Sherborooke. 2015.

[59] Bianca B. Dagatan, Joel H. Jorolan, Characterization of chitosan as chromium adsorbent, Journal of Scientific Research and Development 3 (5): 229-235, 2016

[60]: Karine le Roux. « Purification chitine par hydrolyse enzymatique a partir de coproduits de crevettes, caractérisations des produits et optimisation du procédé ». Universitéde Nantes. 2012.

[61]: Martin Poirier. «Fractionnement et caractérisation de la chitine dans le systèmeN,N-dimethylacetamide/chlorure de lithuim ». Universite de Laval. 2000.

[62] Suyeon Kim, Competitive Biological Activities of Chitosan and Its Derivatives: Antimicrobial, Antioxidant, Anticancer, and Anti-Inflammatory Activities, International Journal of Polymer Science, 2018. (https://doi.org/10.1155/2018/1708172).

[63]: https://fr.wikipedia.org/wiki/Fuchsine (consulté le 07/07/2021).

[64]: https://fr.wikipedia.org/wiki/Violet_de_gentiane (consulté le 07/07/2021).