REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En Chimie

Spécialité : Chimie Macromoléculaire

Par :

Belkadi Rabea & Fergani Madina

Thème :

Production et caractérisation d'un biopolymère

Soutenue publiquement le : 21 /06 /2018. Devant le jury composé de :

Dr.Boucherit N	Grade : MCB	Université de Médéa	Présidente
Dr. Terkmen N.	Grade : MCB	Université de Médéa	Examinatrice
Dr. Arbia W.	Grade : MCB	Université de Médéa	Encadreur

Année universitaire 2017/2018

Remerciement

Nous tenons a remercier en premier lieu le dieu « ALLAH DJELLA DJALALOHOU »qui nous a donne le courage et la volonté durant de notre travail pour qu'il soit une réussite méritée.

Nous tenons à exprimer nos remerciements a notre promoteur Madame « ARBIA WASSILA »pour l intérêt constant qu'elle a porté a ce travail et pour ces précieux conseils et son aide durant tout ce travail.

Nos remerciements s adressent également a tout l ensemble de jury pour avoir voulu accepter de juger ce travail et a toutes les personnes qui ont contribue de près ou de loin a l élaboration de ce modeste travail.

A toute et tous nous disons « MERCI »

Dédicace

Avec une énorme joie, je dédie ce modeste travail

Aux plus chères personnes de ma vie

A mes chers parents qui m ont donne tout le courage et le soutien

A mes chères sœurs Soumia, Zineb et Radja

A ma grande famille Fergani et Chikh touhami

A mon binôme Rabea et sa famille pour le quel je souhaite une vie pleine de joie et de réussite

A toute la promotion

« Chimie macromoléculaire 2017/2018 »

A tous ceux qui je porte dans mon cœur …

MADINA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mess parents pour leur amour et leur soutien .

A mon mari kamel qui était toujours a cote de moi.

A mes frères et sœurs et toute la famille Belkadi.

A mon binômes Madina et sa famille pour le quel je souhaite une vie pleine de joie et de réussite.

A mes collègues .

A tous ceux qui ont contribue a ce travail.

RABEA

الملخص

الهدف من عملنا هو إنتاج ال كيتوزان من الكتلة الحيوية البحرية وتشكيل البيوفيلم. سمح لنا استخدام 200 جرام من مسحوق قشور الجمبري بالحصول على 42 جرام من الكيتوزان بعائد قدره 21٪. من الكيتوزان القابل للذوبان 100٪ في محلول حمض الخل بنسبة 1٪ مع لزوجة جوهرية قدرها 0.1301 دل / غ و الوزن الجزيئي منخفض يقدر حوالي 59.66 كيلو دالتون.حضرنا ثلاثة انواع بيوفيلم متكونة من : الكيتوزان،الكيتوزان الغليسيرول والكيتوزان زيت الزيتون المزيج كيتوزان و الغليسيرول لم يسمح بتشكيل البيوفيلم بسبب سوء تبخر المذيبات.و قد أظهر اختبار امتصاص الماء بان بيوفيلم الكيتوزان هو اعلى امتصاص من بيوفيلم المتكون من زيت الزيتون و الكيتوزان و كلاهما غير قابل للذوبان ، في الماء وحمض الخليك وحاجز الفوسفات.

وقد أظهرت دراسة نشاط مضادات الميكروبات لكل من بيوفيلم الكيتوزان و الكيتوزان وزيت الزيتون المتحصل عليها ضد السلالات البكتيرية والفطرية المختارة من الأغشية الحيوية ان ليس لهما أي تأثير على السلالات البكتيرية.

الكلمات المفتاحية: الكيتوزان ، البيوفيلم ، القابلة للتحلل الحيوي ، زيت الزيتون

Résumé

Le but de notre travail est de produire du chitosane à partir de la biomasse marine et de la formation de biofilms. L'utilisation de 200 g de poudre de crevettes nous a permis d'obtenir 42 g de chitosane avec un rendement de 21%. De chitosane pour obtenir 100% soluble dans une solution d'acide acétique à 1% avec le noyau de la viscosité de 0,1301 dl / g et un poids moléculaire d'environ 59,66 kg /Dalton. Les biofilms composé de trois types: le chitosane, l'huile d'olive et glycérol .le glycérol n'a pas été autorisé pour former Biofilm dû à l'évaporation des solvants. Le test d'absorption d'eau a montré que le chitosane est beaucoup plus élevé que le biofilm fabriqué à partir d'huile d'olive et de chitosane car les deux sont insolubles dans l'eau, l'acide acétique et les phosphates.

Etude de l'activité a montré chitosane anti-microbes contre biofilm souches bactériennes et fongiques choisies parmi les membranes vitales qui ont été obtenues (chitosane et l'huile d'olive) n'a pas d'effet sur les souches pathogènes sélectionnées.

Mots-clés: chitosane, biofilm, biodégradable, huile d'olive

Abstract

The goal of our work is to produce chitosan frome marine biomasse and biofilm formation. The use of 200 g of shrimp Powder allowed us to obtain 42 g of chitosane with a yield of 21%. Chitosan to obtain 100% soluble in a 1% acétique acide solution with the core of the viscosity of 0.1301 dl / g and a molecular weight of about 59.66 kg / Dalton. Biofilms composed of three types : Chitosan, olive oïl and glycérol. Glycérol was not allowed to form Biofilm due to évaporation of solvants. The water absorption test showed that Chitosan is much higher than the biofilm made from olive oïl and chitosan because both are insoluble in water, acetic acid and phosphates.

Study of the activity showed chitosan anti-microbes against biofilm bacterial and fungal strains selected from the vital membranes that were obtained (chitosan and olive oïl) has no effect on the selected pathogenic strains.

Keywords: chitosan, biofilm, biodégradable, olive oi

Fig. I. 1. Structure de la chitine (1), du chitosan (2) .	**4**
Fig. I. 2. Méthode de production de la chitine et du chitosane	**7**
g. I. 3. Réaction de désacétylation de la chitine	**8**
Fig. I. 4. Empilement des chaînes du chitosane hydraté (a) selon l'axe a, (b) selon l'axe c. Les cercles gris indiquent un atome d'hydrogène .	**12**
Fig. I. 5. Analyses DSC d'un chitosane pur (a) premier balayage (b) deuxième balayage	**13**
Fig. I. 6. TGA du chitosane pour différentes vitesses de chauffe, ainsi que la dérivée du signal de 200 à 400°C.	**14**
Fig.II. 1. Schématisation du mécanisme de plastification à l'échelle moléculaire (d'aprèsTrotignon et al., 1996)	**21**
Fig.III. 1. Test de solubilité de chitosane	**29**
Fig. III. 2. Viscosimètre capillaire en utilisant un tube a vessie	**30**
Fig. III.3. Viscosimètre capillaire en utilisant un tube a vessie	**30**
Fig. III. 4. Etude de l'activité antimicrobienne des biofilms de chitosane, chitosane-huile (d'olive sur *Candida albicans)*	**32**
Fig. IV. 1. Spectre infra rouge du chitosane commercial	**34**
Fig. IV. 2. Spectre infra rouge du chitosane obtenu	**35**
Fig. IV. 3. Evolution de la viscosité réduite en fonction de la teneur en chitosane à 30°C.	**36**
Fig. IV. 4. Les biofilms du chitosane	**37**
Fig. IV. 5. Les biofilms (chitosane- huile d'olive- glycérol) (a) 30 ml chitosane (1%), 3 ml huile d'olive, 2 ml glycérol (b) 30ml chitosane (1%), 3 ml huile d'olive, 3 ml glycérol (c) 40 ml chitosane (1%), 4 ml huile d'olive, 3 ml glycérol	**38**
Fig. IV. 6. Les biofilms (a) 30ml chitosane (1%), 3ml huile d'olive (b) 40ml chitosane (1%), 4 ml huile d'olive	**38**
Fig. IV. 7. Spectres Infra-Rouge de biofilm du (a) chitosane et (b) chitosane-huile d'olive	**39**
Fig. IV. 8. Absence de l'activité antimicrobienne des biofilms de chitosane, chitosane-huile d'olive sur *Candida albicans*	**41**

Tableau I. 1. Les différentes sources de chitine	**5**
Tableau I. 2. Les domaines d'application de la chitine et du chitosane	**16**
Tableau III. 1. Matériel de laboratoire	**27**
Tableau IV. 1. La quantité et le rendement du chitosane préparé	**33**
Tableau IV. 2. Les pics caractéristiques du chitosane	**36**

Liste des abréviations :

AE : Absorption de l'eau.

CS : chitosan .

DA : le degré d acétylation.

DD : le degré de desacetylation.

DMF : diméthylformamide.

DMA l'analyseur mécanique dynamique:

DMAc : diméthylacétamide

DSC : calorimétrie différentielle à balayage.

GLY: glycerol.

HO :huile d olive

IR-TF: infrarouge a transformée de fourrier

LiCl : chlorure de lithium.

MM : masse molaire.[g/mol.]

PM : poids moléculaire.[kDa]

SEC : chromatographie d'exclusion stérique.

TGA : la thermogravimétrie.

Tg : la température de transition vitreuse.

UV-VIS : la spectrophotométrie ultraviolette visible.

Symboles

W : weight (masse en gramme)

η : viscosité intrinsèque (dL/g)

η_{red}: viscosité réduite (dL/g)

C : concentration (mole/l)

Introduction générale

Partie théorique

Chapitre I

Chapitre II

Partie expérimentale

Chapitre III

Chapitre IV

Conclusion générale

Introduction générale	1
Chapitre I Chitine et chitosane : définition, propriétés et applications	
I. 1. Historique	3
I. 2. Définition et structure de la chitine et le chitosane	3
I. 3. Source de la chitine et du chitosane	4
I. 4. Préparation de la chitine et du chitosane	5
I. 4. 1. Déminéralisation	5
I. 4. 2. Déprotéinisation	6
I. 4. 3. Désacétylation de la chitine	7
I. 5. Propriétés physicochimiques	8
I. 5. 1. de la chitine	8
I. 5. 2. Propriétés du chitosane	8
- Solubilité et propriété polyélectrolyte	9
- Le degré de Désacétylation (DD)	9
- La masse moléculaire	10
- Cristallinité	10
- Viscosité	10
-Propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane	10
Autres propriétés physiques et chimiques	11
- Propriétés cristallins du chitosane	11
- Propriétés thermiques du chitosane	12
1) Analyse thermique	12
2) Dégradation thermique du chitosane	14
I. 6. Les applications de la chitine et du chitosane	14
Chapitre II Les biofilms	
II. 1. Introduction	17
II. 2. Films à base de biopolymères naturels	17
II. 3. Définition du film comestible	18
II. 4. Paramètres influençant les propriétés fonctionnelles des films comestibles	20
II. 4. 1. Influence du plastifiant	20
II. 4. 2. Influence de la concentration en eau et du gradient d'humidité relative	21
II. 4. 3. Influence de l'épaisseur des films	22
II. 5. Films à base de polysaccharides	22

II. 5. 1. Mise en forme des films	23
II. 5. 1. 1. Procédés par voie sèche	23
II. 5. 1. 2. Procédés par voie humide	23
II. 5. 2. Application du chitosane en tant que film d'emballage comestible et enrobage	24
II. 5. 3. Paramètres influençant les propriétés des films de chitosane	25
II. 5. 3. 1. Degrés d'acétylation et masse molaire	25
II. 5. 3. 2. Effet du plastifiant	26
II. 5. 3. 3. Effet des conditions de séchage	26
Chapitre III Matériel et méthodes	
III. 1. Matériels de laboratoire	27
III. 2. Préparation du chitosane à partir de déchets de crevette	27
III. 2. 1. La déminéralisation	27
III.2.2.La desacetylation	28
III. 2. 3. La décoloration ou Blanchiment	28
III. 3. Préparation de biofilms	
III. 4. Caracterisation physicochimique du chitosane et des biofilms préparés	29
III. 4. 1. Test de solubilité du chitosane	29
III. 4. 2. Analyse infrarouge IR	29
III. 4. 3. Viscosité et poids moléculaire de chitosane	29
III. 4. 4. Caractérisations des biofilms	31
III. 4. 4. 1. Analyse infrarouge IR	31
III. 4. 4. 2. Absorption de l'eau	31
III. 4. 4. 3. La solubilité	31
III. 4. 4. 4. Activité antibactérienne	31
Chapitre VI Résultats et discussion	
IV. 1. La quantité du chitosane produit	33
IV. 2. Caractérisation du chitosane produit	33
IV. 2. 1. Test de solubilité	33
IV. 2. 2. Caractérisation par spectroscopie FTIR	33
IV.2.2.2 Détermination du poids moléculaire et de la viscosité du chitosane (crustacé)	36
IV. 2. 2. 3. Caractérisation des biofilms du chitosane et les biofilms composites	37

a) Par spectroscopie infrarouge	38
b) Absorption de l'eau	40
c) La solubilité	40
d) L'activité antimicrobienne	40
Conclusion général	42

Introduction :

Avec la demande mondiale croissante en matière plastique qui a dépassé les 250 millions de tonnes en 2012, le prix alarmant du pétrole et les préoccupations environnementales, les matières plastiques biodégradables se positionnent parmi les meilleures alternatives.

Dans le secteur de l'emballage, premier secteur demandeur en plastique, l'emballage alimentaire est celui qui présente la croissance la plus élevée.

Des travaux ont montré que l'utilisation des films comestibles permet d'améliorer la conservation des produits alimentaires tout en maintenant les qualités microbiennes, biochimiques et organoléptiques (Peyron, 1991). L'enrobage des aliments par des films comestibles est un nouveau concept dans l'industrie de la post-récolte pour améliorer et prolonger la durée de conservation des hits et légumes (LowingetCuns, 1982).

De nombreux matériaux glucidiques, protidiques ou lipidiques utilisés sous différentes formes, seuls ou en mélange, ont été proposés dans la formulation de films ou d'enrobages comestibles. Baldwin *et*al.,(1995) ont montré que les enrobages à base de polysaccharides sont très efficaces pour la conservation des fruits et des légumes frais. Ces types d'enrobages ont une forter ésistance au transfert de gaz (CO_2, O_2) mais n'offrent aucune résistance au transfert de vapeur d'eau, à cause de leur nature hydrophile (Kester et al., 1986; Guilbert et al.,1989). Les polysaccharides les plus utilisés dans à l'enrobage des produits alimentaires sont : la pectine, les dérivés cellulosiques, les alginates, la carragénine, les gommes arabiques, et le chitosane. Ces types de polysaccharides sont des polymères linéaires, très disponibles, peu coûteux et non toxiques (Amilali, 1999) et sont principalement utilisés comme agents stabilisants, épaississants et gélifiants. Ils possèdent aussi de bonnes propriétés filmogènes pouvant être mises à profit pour une utilisation en tant qu'enrobage ou film comestible.

Récemment, la recherche sur le développement de films comestibles à base de polysaccharides a été orientée vers le chitosane (Baldwin et al., 1995). Le chitosane est un biopolyrnère cationique (Hirano et al., 1989produitcommercialement par desacetylation de la chitine extraite de l'exosquelette des crustacés(Amilali, 1999). Ce polymère a une activité inhibitrice de la croissance de plusieurs genres de champignons et est reconnu comme fongicide dans le domaine pharmaceutique et agricole (El Ghaouth et al., 1992). De plus, le film de chitosane est biodégradable, clair, résistant et flexible.

L'objectif de notre travail est la préparation d'un biofilm hydrophobe composé d un mélange de chitosane et d'huile d'olive par le procédé du mélange en solution (casting).

Ce mémoire s'articule autour de quatre chapitres :

I. Le chapitre I est consacré à la définition, propriétés et applications de la chitine et du chitosane ;

II. Le chapitre II présente une description théorique sur les biofilms

III. Le chapitre III présente l'ensemble d'appareillage utilisé et les modes opératoires suivis lors de cette étude.

VI. Le chapitre VI est consacré à la discussion de nos résultats.

I. 1. Historique

La chitine a été découverte en 1811 par le français Henri Braconnot, qui a isolé une substance fibreuse, insoluble dans les solutions aqueuses, d'un certain type de champignon. Une décennie plus tard, en 1823, la même substance a été trouvée dans certains insectes (coléoptère) et a été ensuite nommée chitine (provient du mot grec ^kitos^ qui signifie l'enveloppe). En 1859, C. Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin et a observé son comportement. La substance, résultat du traitement alcalin, a pu être dissoute dans les acides. Cependant, ce n'est qu'en 1894 que cette substance a été nommée chitosane par Hoppe Seyler. Entre 1930 et 1940, ces biopolyméres (la chitine et le chitosane) ont suscité beaucoup d'intérêt dans le monde oriental, principalement pour l'application dans le domaine médical et la purification de l'eau. Depuis 1970, la production industrielle et l'utilisation de ces deux biopolyméres sont en constante augmentation grâce à leur abondance dans la nature et leurs ressources renouvelables. Actuellement, la production de la chitine et du chitosane à partir des carapaces de crabes et de crevettes, est économiquement rentable

Ainsi, les différentes investigations conduisent à la découverte de nouveaux dérivés, et à la définition des caractéristiques et propriétés de la chitine et du chitosane. Leurs applications deviennent nombreuses et interviennent dans des domaines variés tel que l'agro-alimentaire, le textile, l'agriculture, mais aussi l'environnement, la santé...

I. 2. Définition et structure de la chitine et du chitosane

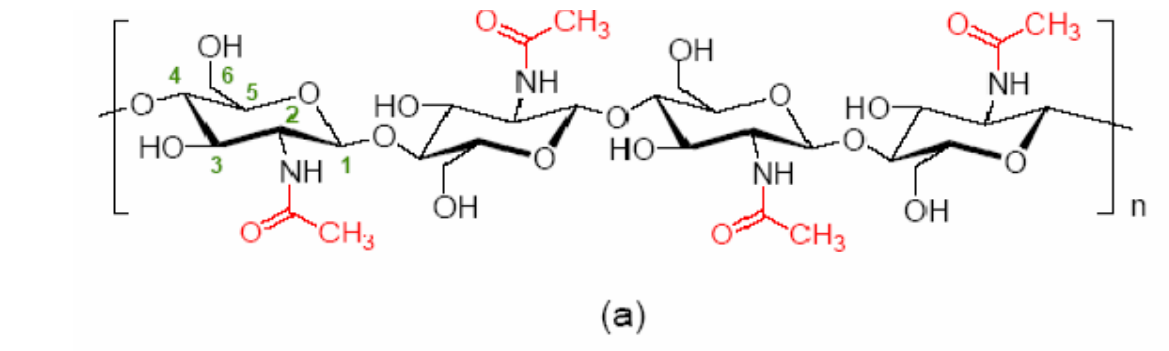
I. 2. 1. La chitine

La chitine est le deuxième bio polymère le plus abondant dans la nature après la cellulose. La chitine n'a pas une structure chimique unique mais plusieurs, elle englobe plusieurs polysaccharides composés d'unités de N-acétyle-β-D-glucosamine (de 50% a 100%) et d'unités D-glucosamine (de 0 a 50%),liées entre elles par des liens glycosidiques de type β (1→4).

I. 2. 2. Le chitosane

Le chitosane est un biopolyméres linéaire et hydrophile obtenu industriellement par la desacetylation partielle de la chitine dans un milieu alcalin. Il se trouve beaucoup plus rarement que la chitine dans la nature. Le chitosane est présent naturellement dans la membrane cellulaire de certains champignons.C'est une substance semi-cristalline qui cristallise dans le système orthorhombique.

Les structures de la chitine et du chitosane sont donc caractérisées par la présence de groupements amine et de groupements acétamide, respectivement, auxquels il convient d'ajouter la présence de nombreuses fonctions hydroxyles (primaire sur C6 et secondaire sur C3) qui confèrent un fort caractère hydrophile notamment au chitosane (Fig. I. 1).



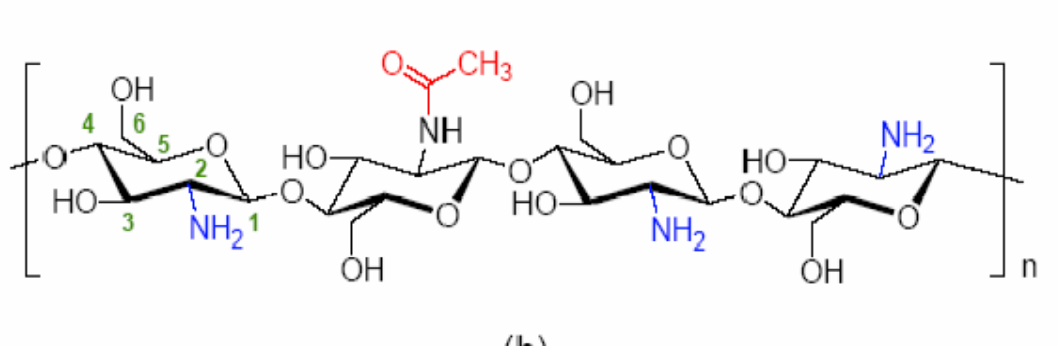


Fig. I. 1. Structure chimique de la chitine (a), du chitosan (b)

I. 3. Source de la chitine et du chitosane

La chitine est le polymère de structure des exosquelettes de tous les arthropodes (crustacées, insectes, arachnides) et des endosquelettes des céphalopodes (seiches (20%), calamars (40%,…). La chitine est présente par exemple dans les crevettes (22%), les homards (17%), les crabes (10%), les langoustines (32%), les calamars, les insectes (blattes, fourmis) ou encore les algues, les levures et les champignons (tableau I. 1).

La source majeure du chitosane vendu commercialement provient de la désacetylation de la chitine obtenue à partir de crustacées.

La production de la chitine (et 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. Néanmoins, de nouvelles voies alternatives sont apparues comme par exemple la production de biopolymére sa partir de cultures de moisissures (*Aspergillus niger*), en raison notamment des inquiétudes sanitaires liées a l'encéphalite spongiforme bovine (maladie de la vache folle). La chitine obtenue à partir d'une source fongique bien caractérisée et produite selon un procédé standardisé pourrait être utilisée dans le domaine biomédical.

Tableau I. 1. Les différentes sources de chitine

Végétaux inférieurs	Champignons	Annélides	Mollusques	Arthropodes		
				Crustacés	Arachnides	Insectes
Algues Lichen	Levures Ascomycètes *Penicillium* Blastocladiacés Chytridiacés	Lombric Sangsue	Seiche Calmar	Homards Crabes Crevettes Langoustines Krill etc.	Scorpions Araignées	Fourmis Blattes Coléoptères etc.

I. 4. Préparation de la chitine et du chitosane

La grande disponibilité des carapaces de crevettes et leur teneur élevée en chitine en font la source principale de ce produit. L'extraction de la chitine de la carapace nécessite au moins deux étapes distinctes lorsque l'on procède par méthode chimique : la déminéralisation en milieu acide et la déprotéinisation en milieu basique. Ces deux processus peuvent être effectués dans n'importe quel ordre, mais l'efficacité de la réaction effectuée en premier est toujours moindre. Pour obtenir un produit possédant un minimum de protéines, il est préférable de déminéraliser d'abord puis d'effectuer la déprotéinisation. Bien que la chitine soit résistante aux acides et aux bases, celle-ci peut être légèrement détériorée par les deux traitements (Percot et al.., 2002).

I. 4. 1. Déminéralisation

La déminéralisation de la chitine s'effectue habituellement avec une solution d'acide diluée, généralement du HC1, afin de transformer les minéraux non solubles de la carapace en sels solubles. Le carbonate de calcium, principal composé minéral de la carapace, réagitavec le HC1 pour former du chlorure de calcium, de l'eau et du gaz carbonique comme décrit dans la réaction suivante :

$$2\,HCl_{(aq)} + CaCO_{3(s)} \longrightarrow CaCl_{2(aq)} + H_2O_{(1)} + CO_{2(g)} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1)$$

La plupart des autres minéraux présents réagissent de façon similaire et donnent des sels solubles en présence d'acide. Les sels formés peuvent être séparés de la chitine par simple filtration suivie de lavage. Une grande quantité de mousse est produite durant la déminéralisation résultant du dégagement du gaz carbonique (No et Hur, 1998).

I.4.2. Déprotéinisation

La déprotéinisation de la chitine consiste à solubiliser les protéines présentes dans la matrice de chitine 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 à température élevée est généralement utilisé pour solubiliser une plus grande partie des protéines. Plusieurs études font état de divers protocoles afin d'optimiser le processus (Percot et al., 2002, Synowiecki et Al-Khateeb, 2003). Mais aucun procédé n'est parvenu à éliminer entièrement les protéines dans une période inférieure à six heures. Dans les meilleurs cas, il reste toujours quelques résidus protéiques attachés à la chitine. Il semble que les liens entre les protéines et la chitine diffèrent d'une espèce à l'autre et que le traitement doit varier.

La chitine est présente dans les co-produits sous forme de complexe chitine-protéines-minéraux (principalement du carbonate de calcium). Le procédé de production de la chitine et du chitosane est résumé par les étapes décrites dans l’organigramme de la figure :

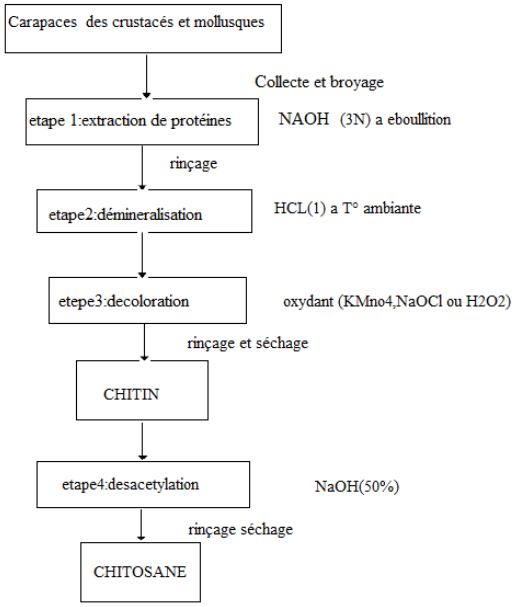


Fig. I.2. Méthode de production de la chitine et du chitosane

La décalcification des carapaces se produit selon la réaction suivante :

$CaCO_3 + 2HCl \rightarrow CaCl_2 + CO_2 + H_2O$……...(2)

I. 4. 3. Désacétylation de la chitine

La chitine peut ensuite être désacétylée (Fig. I. 4) pour obtenir le chitosane par voie chimique, en utilisant la soude concentrée, ou par voie enzymatique en utilisant la chitine désacétylase. La frontière entre le chitosane et la chitine correspond à un degré de désacétylation DD 60-70 % en dessous composé est nommé chitine.

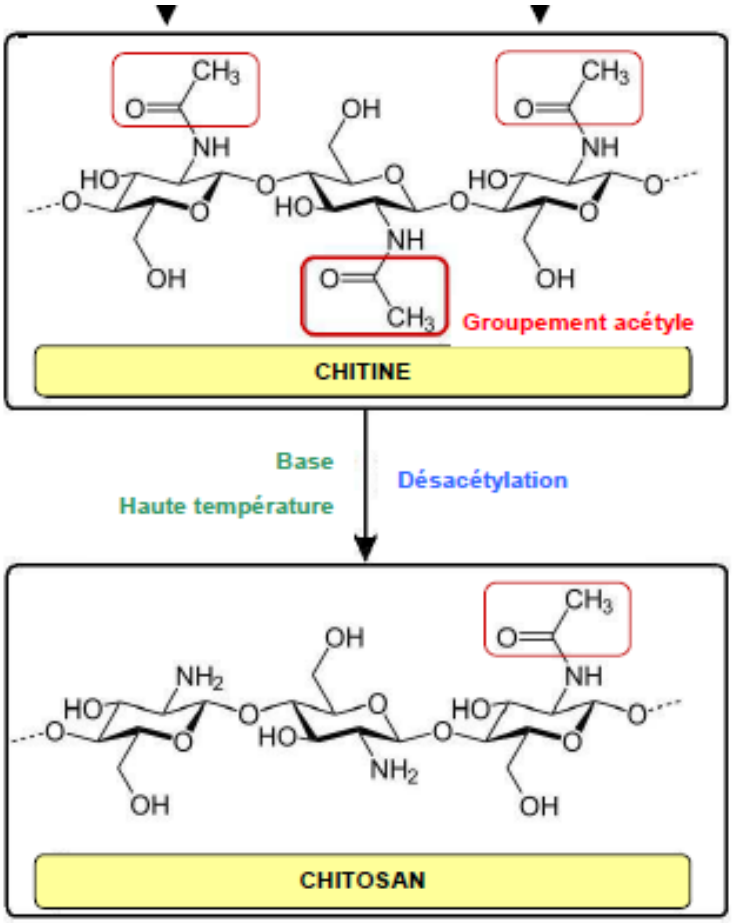


Fig. I. 3. Réaction de désacétylation de la chitine

I. 5.Propriétés de la chitine et du chitosane

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.

I. 5. 1. Propriétés de la chitine

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°C sans fondre. Elle est soluble dans les mélanges diméthylformamide (DMF) /chlorure de lithium (LiCl) ou diméthylacétamide (DMAc)/LiCl. 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 chitine est biodégradable et non toxique. Elle peut être hydrolysée facilement par le lysozyme et par les chitinases.

I. 5. 2. Propriétés du chitosane

- Solubilité et propriété polyélectrolyte

Le chitosan est insoluble dans l'eau, les solutions alcalines concentrées ou diluées et dans les solvants organiques les plus courants. Sa solubilisation peut être obtenue par protonation de ses groupements amine dans les acides dilués. En solution dans un acide dilué, le chitosan se comporte comme un polyélectrolyte cationique de forte densité de charge. S'il est considéré comme une polyamine, ses propriétés dépendent fortement du pH du milieu. Le pKa intrinsèque de la fonction amine dans ce polymère est compris entre de 6,3-6,7, ce qui signifie qu'en-dessous de ce pH, le chitosane est cationique et soluble. Le polymère peut alors s'associer sélectivement avec les espèces anioniques et être ainsi un excellent agent de floculation et former des complexes polyanion-polycation (menant à la préparation de membranes par exemple). Au-delà d'un pH de 6.5 environ, le chitosane précipite et la chaîne macromoléculaire ne comporte plus de groupements ionisés. Il possède alors de bonnes propriétés chélatantes dues, en particulier, au doublet électronique libre de l'atome d'azote. Enfin, la présence de la fonction amine le long de la chaîne macromoléculaire permet, au contraire de la cellulose par exemple, de réaliser des réactions chimiques spécifiques à cette fonction (telles que la N-alkylation et la N-carboxylation).

la solubilité du chitosan est aussi dépendante du DDA et de la méthode de déacétylation utilisée (Yi et al., 2005). En effet, lorsque le DDA est faible, le chitosane est peu soluble car les groupes amines sont peu nombreux. Il est alors préférable d'utiliser un chitosane au DDA supérieur à 70 % pour avoir une solubilité minimale de celui-ci. La solubilité est aussi dépendante de la nature de l'acide utilisé, de la force ionique et de la distribution des groupes acétyle sur la chaîne macromoléculaire (Crini, et al., 2009).

Lorsque le degré de protonation, qui est fonction de la concentration initiale de l'acide utilisé, augmente, la solubilisation du chitosane progresse et celle-ci est complète pour un degré de protonation supérieur à 0,5 (Rinaudo et al., 1999a, 1999b). Le solvant le plus couramment utilisé pour la dissolution du chitosane est l'acide acétique en solution aqueuse. Les équations d'équilibre sont les suivantes lorsque le chitosane est dispersé dans une solution d'acide acétique :

$$CH_3COOH + H_2O \longrightarrow CH_3COO^- + H_3O^+ \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (3)$$

$$Chit\text{-}NH_2 + H_3Chit\text{-} \longrightarrow NH_3^+ + H_2O \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (4)$$

- 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 chitosan et apparaît donc comme le plus important. La

détermination du DD est l'une des analyses de routine lors de l'extraction de la chitine et la préparation du chitosane. Plusieurs méthodes sont proposées à savoir, le titrage potentiométrique (ou volumétrique), la spectrométrie infrarouge (IR), la spectrophotométrie ultraviolet visible (UV-VIS), l'analyse élémentaire, et la résonance magnétique nucléaire (RMN).

- La masse moléculaire

Les chitosanes obtenus industriellement ont une masse molaire (MM) de l'ordre de 100-500 kDa. La détermination de la MM peut se faire par des mesures viscosimétriques, par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à différentes techniques de détection (MALLS) (réfractométrie, microviscosimétrie, diffusion statique de la lumière multi-angle)

-Cristallinité

La cristallinité est un paramètre important car elle contrôle un certain nombre de propriétés comme l'accessibilité des sites internes dans les chaînes macromoléculaires, les propriétés de gonflement dans l'eau ou encore les propriétés diffusionnelles. La cristallinité est, en général, déterminée par des mesures de diffraction de rayons X. En fait, le chitosane est généralement une substance semi-cristalline.

-Viscosité

La viscosité est liée à la conformation des chaînes macromoléculaires en solution. Elle dépend, non seulement du DD, du MM, mais aussi du pH car ces deux paramètres déterminent la densité de charge sur la chaîne de polymère. Plus le pH est bas, plus la viscosité est donc forte. La viscosité augmente également avec le DD car plus le polymère est désacétylée, plus la proportion de groupements amines libres est importante et plus il est soluble. La viscosité augmente également avec la concentration et elle est fonction de la MM des chaînes macromoléculaires. Comme pour les autres polysaccharides, la viscosité chute lorsque la température augmente.

- Propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane

Le chitosane se présente sous la forme d'un solide amorphe. C'est l'un des rares poly électrolytes naturels cationiques existant dans la nature. En solution dans un acide dilué, le chitosane se comporte comme un polycationique de forte densité de charge, en raison de la protonation des groupements $–NH_2$. Le chitosane est biocompatible et biodégradable par les microorganismes possédant des enzymes qu'on appelle chitosanase. Il ne présente aucun comportement antigénique, mais possède un caractère antithrombogènique et hémostatique. Il montre des propriétés cicatrisantes remarquables. Le chitosane a également des propriétés

inhibitrices sur la croissance de nombreux parasites et infections. Il a de plus des propriétés immunologiques, anti tumorales, antibactériennes et antifongiques.

- Autres propriétés physiques et chimiques

Le chitosane est un matériau versatile qui prend des formes physiques modifiables. C'est un matériau très stable en phase solide et il a une conservation quasi-infinie en solution. Il possède des propriétés de rétention d'eau, de chélation d'ions, de complexassions et d'adsorption de molécules ou des polymères. Le chitosane est un agent de floculation dans le traitement des eaux polluées grâce à son association sélective avec les espèces anioniques, il peut aussi former des complexes poly anionpoly cation menant à la préparation de membrane.

- Proprieties cristallines du chitosane

Le chitosane est donc un polymère semi-cristallin à l'état solide. La diffraction de rayons X du chitosane hydraté a montré trois réflexions principales du chitosane pour 2θ égal à 11,40°, 19,80° et 22,52° qui correspondent respectivement aux plans 020, 100 et 110 (Farooqahamedet al., 2003). Grâce à la diffraction d'électrons, il a été déterminé que le motif élémentaire du chitosane hydraté est orthorhombique avec pour taille a = 0,895 nm, b = 1,697 nm et c = 1,034nm. Le motif élémentaire est composé de deux chaînes de chitosane antiparallèles liées par des liaisons hydrogènes intermoléculaires, formant une structure en bande.Le paramètre c correspond à la distance entre deux chaînes antiparallèles. L'empilement de ces bandes forme la structure en 3 dimensions comme représentée dans la figure I. 5 (Okuyama et al., 2000).

Les dimensions des cristaux de chitosane vont dépendre de l'origine du chitosane et de sa forme hydratée ou non. En effet, lors de la déshydratation, un réarrangement va s'organiser selon les axes *a*, *b*, et *c* afin de remplir l'espace laissé par les molécules d'eau (Okuyama et al., 1997).

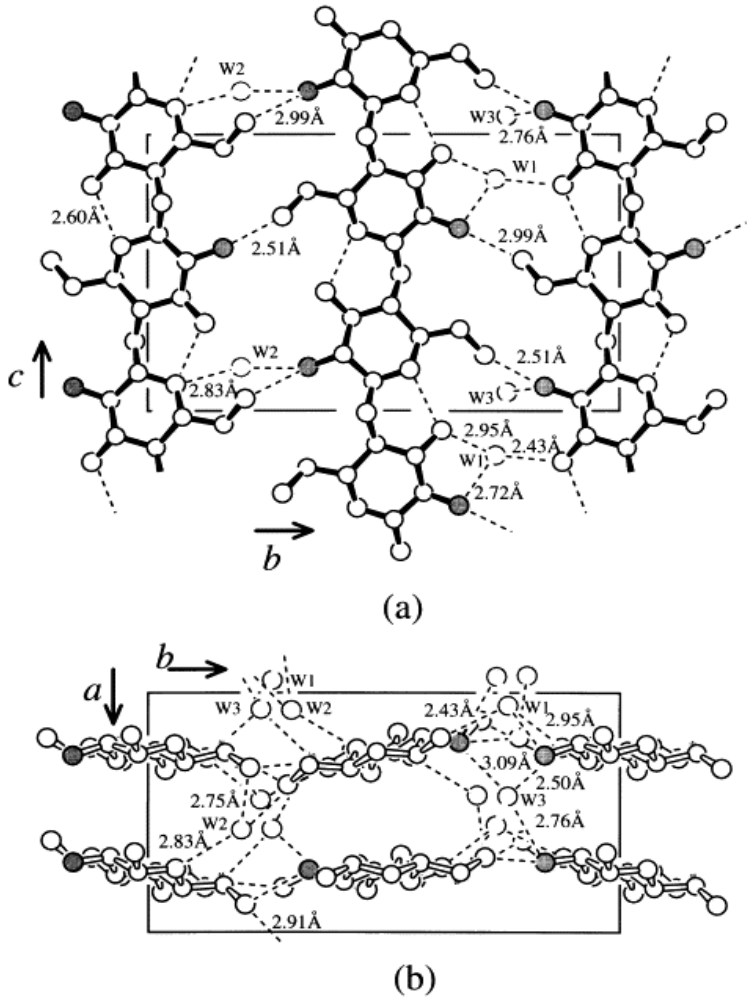


Fig.I. 4. Empilement des chaînes du chitosane hydraté (a) selon l'axe a, (b) selon l'axe c. Les cercles gris indiquent un atome d'hydrogène (Okuyama, et al., 2000)

- Propriétés thermiques du chitosane

1) Analyse thermique

Les transitions thermiques typiques, telles que les températures de fusion, de dégradation ou de Transition vitreuse, du chitosane peuvent être étudiées grâce à la calorimétrie différentielle àbalayage (DSC), la thermogravimétrie (TGA) et à l'analyseur mécanique dynamique (DMA).

Il a été montré par DSC que le chitosane ne présentait pas de température de fusion, sadégradation a lieu avant. La figure est présente la trace obtenue pour le chitosane en DSC. Lorsdu premier balayage (Fig.I. 5a), effectué de -100 à 200°C pour éviter la dégradation du chitosane et pour annuler l'historique thermique, on observe le pic d'évaporation de l'eaurésiduelle entre 75 et 125 °C. Lors du second balayage (Fig.I. 5b), effectué de -100 à 400

°C,on observe directement la dégradation du chitosane à partir de 250 °C. Les courbes DSC ne montrent pas de cristallinité, ni de changement de phase.

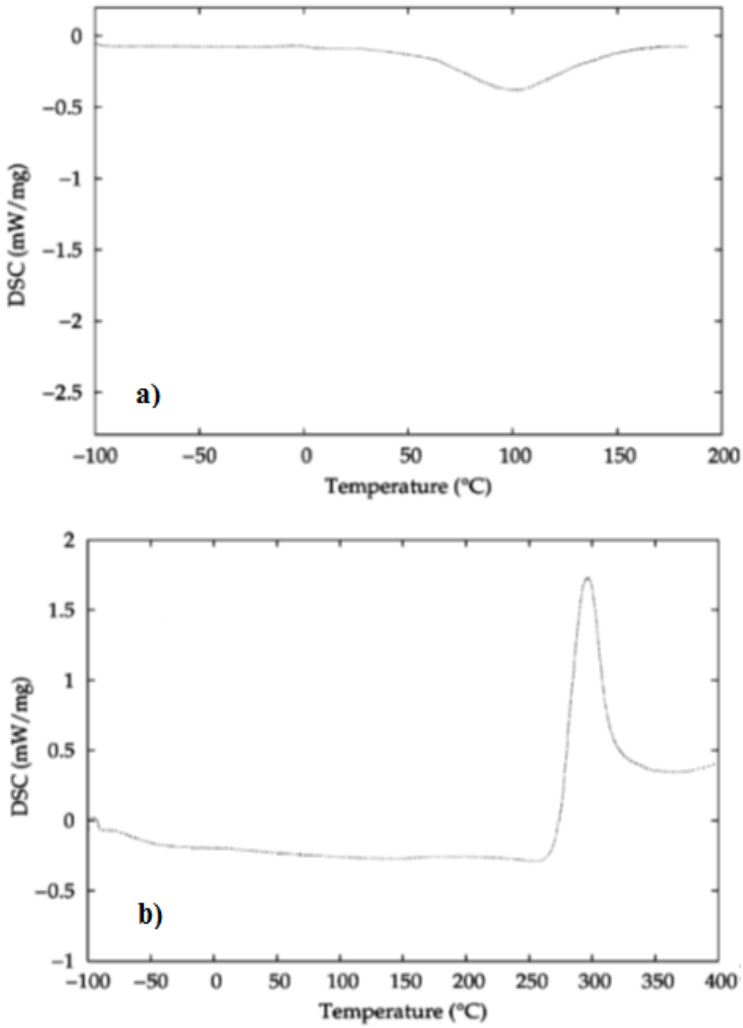


Fig.I. 5. Analyses DSC d'un chitosane pur (a) premier balayage (b) deuxième balayage (Neto et al., 2005)

L'étude de la température de transition vitreuse (Tg) est plus controversée. En effet, on trouvedans la littérature plusieurs valeurs de Tg et aussi la démonstration qu'elle n'est pas mesurable -ou qu'elle n'existe pas - pour le chitosane. Mucha et Pawlak (2005) ont montré que la Tg du chitosane était située entre 156 et 168 °C, en fonction du DDA du chitosan, Sakurai et al. (2000) l'ont estimée à 203°C, Quijada-Garrido et al.(2006) l'ont quant à eux mesurée à 85°C, tandis que Dong et al. (2004) l'ont évaluée entre 140 et 150 °C.Souvent la DSC et la DMA ont été toutes les deux utilisées pour déterminer la Tg, il apparaît quecela reste compliqué de déterminer la bonne valeur pour le chitosane. Finalement, on constateque

les auteurs attribuent la Tg aux différents pics de relaxation (α, β ou γ) observés en DMA etces estimations ont déjà été contredites par Neto et al. (2005).

2) Dégradation thermique du chitosane

La Figure I. 6, présente la thermogravimétrie du chitosane obtenue par analyse thermogravimétrique (TGA). On observe que la dégradation thermique du chitosane débute auxalentours de 200°C, le maximum de la dérivée du signal est situé entre 290°C et 330°C suivantla vitesse de chauffe utilisée lors de l'analyse.

L'analyse thermogravimétrique du chitosane présente trois étapes remarquablement différentes.

La première a lieu entre la température ambiante et 140°C, une perte de masse de l'échantillontesté de 6% traduit l'évaporation de l'eau faiblement liée au polymère. La deuxième étape de dégradation a lieu entre 200 et 400°C, elle correspond à la finalisation de la déshydratation, à la désacétylation et à la dépolymérisation du chitosane. Enfin, la troisième étape reflète la décomposition résiduelle pour des températures supérieures à 400°C. Grâce à la dérivée du signal, on remarque que lorsque la vitesse de chauffe augmente, la dégradation du chitosane est retardée de quelques degrés (Brittoet Campana-Filho, 2007).

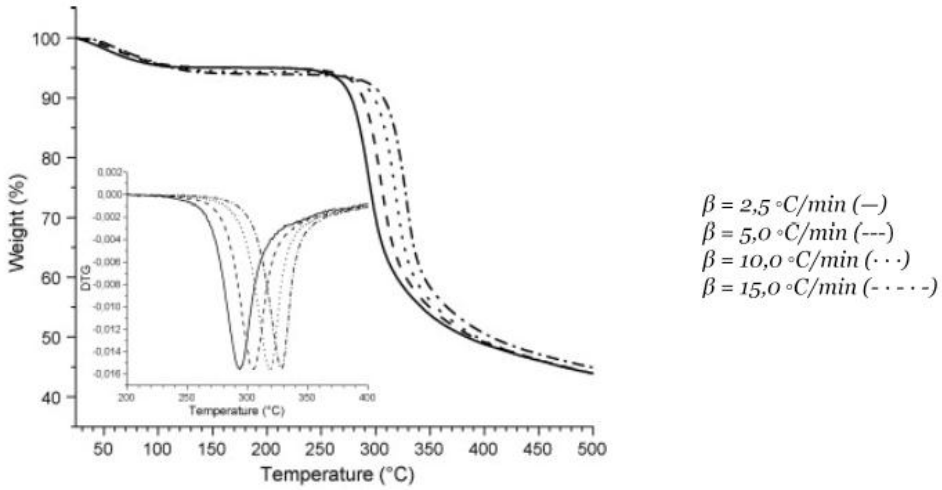


Fig.I.6. TGA du chitosane pour différentes vitesses de chauffe, ainsi que la dérivée du signalde 200 à 400°C (Brittoet Campana-Filho, 2007)

I. 6. Domaines d'application

Le chitosane trouve des applications importantes dans plusieurs domaines (agriculture, santé…) en mettant à profit ses diverses propriétés spécifiques. C'est ainsi que son utilisation

dans des secteurs économiquement porteurs comme les industries alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques ou agricoles, a fait l'objet de nombreux brevets.

Le pouvoir chélatant du chitosane lui permet d'éliminer les métaux lourds, même en de très faibles quantités.Ses excellentes propriétés floculantes à la fois des matières minérales et organiques, mais aussi des microorganismes, en font un matériau de choix pour le traitement des eaux usées. Il peut être utilisé aussi bien à l'état solide qu'en solution afin de complexer les ions métalliques.

Au niveau de l'agriculture, la chitine et le chitosane sont capables de déclencher, chez les plantes, des mécanismes de défense contre les infections et les agressions parasitaires à des doses très faibles (de l'ordre de quelques mg par m^3 d'eau). Le chitosane sert ainsi d'enrobage de semences des céréales. Il renforce par la même occasion le système racinaire et induit l'épaississement de la tige.

En plus des propriétés déjà décrites, les propriétés biologiques (biodégradabilité, bioactivité et biocompatibilité) de la chitine et du chitosane leur permettent des applications pharmaceutiques, biomédicales et cosmétiques. Sa bioactivité est due principalement à son activité biostimulante qui lui donne aussi la propriété d'accélérer la cicatrisation. Ces propriétés cicatrisantes sont utilisées pour fabriquer des fils de suture ou une peau artificielle. En outre, des lentilles de contact à base de chitine, sans propriétés optiques, sont utilisées pour la cicatrisation de cornées endommagées. Le chitosane est aussi antifongique et bactériostatique. Le tableau I. 2, résume les propriétés et les applications de la chitine et du chitosane.

Tableau I.2. Les domaines d'application de la chitin et du chitosane.

Propriétés	Domaine d'application	Application
Propriétés chimiques Polyamine linéaire, réactivité des groupements amine et hydroxyle Propriétés poly électrolytes (en milieu acide) Polymère cationique, forte densité de charges, excellent floculant, adhésion à des surfaces chargées négativement Propriétés biologiques Biocompatibilité : non toxique et biodégradable Bioactivité : accélère-la cicatrisation des plaies, réduit le niveau du cholestérol, stimule le système immunitaire Propriétés chélatantes Propriétés filmogènes Propriétés de rétention d'eau Propriétés antifongiques	Agriculture	Enrobage des semences Fertilisant
	Alimentaire	Additifs alimentaires (liant, émulsifiant, stabilisant….) Clarification des boissons
	Biomédical et pharmaceutique	Agent hémostatique, bactériostatique Anticoagulant Vaisseaux sanguins artificiels Gel dentaire, lentille cristalline Membrane de dialyse Capsules pour la libération des médicaments Réduction du taux de cholestérol Peaux artificielles, pans Accélération de la cicatrisation des blessures Fils de sutures chirurgicaux biorésorbables
	Cosmétique	Emulsifiant, humidifiant, soins capillaires
	Environnement	Purification des eaux par floculation Formation de complexes avec les métaux
	Biotechnologie	Immobilisation des enzymes

II. 1. Introduction

Les bioplastiques sont des biopolymères issus de ressources renouvelables appelées bio-sources. La production de plastiques est passée de 1,5 millions de tonnes en 1950 à 311 millions de tonnes en 2014. Les bioplastiques ne représentent que 0.5 % de cette production en 2014 avec un objectif de 2% pour 2016.

Face au développement des bioplastiques, il est très important de s'interroger dès à présent sur l'impact environnemental de ces biopolymères.

En effet, les plastiques bio-sourcés sont fabriqués à partir de matières renouvelables, qui peuvent provenir directement des produits de la terre, de la mer ou de micro-organismes. Le remplacement d'une ressource fossile par une matière renouvelable est a priori positif pour l'environnement. Cependant la production à grande échelle des plastiques bio-sourcés peut avoir de lourdes conséquences sur notre environnement, telles que la déforestation, l'épuisement des sols et réserves hydrauliques, l'utilisation abusive de pesticides, la production au détriment de la nourriture.

II. 2. Films à base de biopolymères naturels

Ils sont liée aux emballages des mots tels que « biodégradable », « biocompatible », « compostable », « durable », « vert » et « biopolymères ». Cela reflète les préoccupations de la société sur les problèmes environnementaux causés par les déchets solides non-biodégradables et l'épuisement des ressources naturelles. Bien que les produits à base de polymères synthétiques issus de la pétrochimie aient été largement utilisés dans une variété de matériaux d'emballage, ils deviennent une source importante de déchets après leur utilisation en raison de leur faible biodégradabilité. Avec la demande croissante des consommateurs pour des aliments de haute qualité et des préoccupations sur des ressources naturelles limitées et l'environnement, l'utilisation des ressources renouvelables pour produire des matériaux d'emballage biodégradables/comestibles qui peuvent maintenir la qualité des produits et réduire le problème d'élimination des déchets est largement explorée. Par conséquent, une variété de biopolymères renouvelables tels que les polysaccharides, les protéines, les lipides et leurs composites, issus de ressources végétales et animales ont été étudiés pour le développement des matériaux d'emballage comestibles/biodégradables pour remplacer leurs homologues nonbiodégradables issus de la pétrochimie (Kester et Fennema, 1986 ; Krochta et De

Mulder-Johnston, 1997). Les matériaux d'emballage procurent une protection physique et créent de bonnes conditions physico-chimiques essentielles pour une durée de vie satisfaisante des produits. Le système d'emballage, doté de propriétés barrières à l'eau et aux gaz et de propriétés mécaniques appropriées, empêche la détérioration du produit due à des facteurs physicochimiques ou biologiques et maintient la qualité globale au cours du stockage et de la manutention. Après leur durée de vie utile, il est souhaitable que les matériaux d'emballage se biodégradent dans un délai raisonnable sans causer de problèmes de déchets sur l'environnement. Dans ce sens, les matériaux d'emballage à base de biopolymères améliorent la qualité et prolongent la durée de vie du produit en réduisant au minimum la croissance microbienne dans celui-ci. Ils peuvent servir non seulement comme barrières à l'humidité, à la vapeur d'eau, aux gaz et aux solutés, mais aussi servir de vecteurs de certaines substances actives. En outre, les films biopolymères permettent l'incorporation d'une grande variété d'additifs tels que les antioxydants, les agents antifongiques, les agents antimicrobiens, les couleurs et d'autres nutriments (Han, 2000 ; Baldwin, 1994). Parmi les biopolymères naturels, l'amidon est considéré comme la matière première la plus prometteuse pour l'élaboration de nouveaux matériaux plus respectueux de l'environnement à cause de sa faible densité, de son caractère renouvelable et de sa biodégradabilité, de sa disponibilité à travers le monde sous différentes formes et à des faibles coûts. Cependant, les propriétés mécaniques et barrières à la vapeur d'eau relativement pauvres des films biopolymères sont à l'origine d'une limitation majeure à leur utilisation industrielle. Les films à base de protéines et de polysaccharides possèdent en général de bonnes propriétés barrières à l'oxygène à faible humidité relative et ont de bonnes propriétés mécaniques, mais leurs propriétés barrières à la vapeur d'eau sont médiocres en raison de leur caractère hydrophile Des efforts de recherche portant sur l'amélioration des propriétés mécaniques et barrières à la vapeur d'eau des films à base de biopolymères naturels sont faits. Les avantages des films à base de biopolymères naturels sur les matériaux plastiques conventionnels sont nombreux. On peut citer entre autres leur comestibilité et leur biodégradabilité ; leur amélioration des propriétés organoleptiques des aliments telles que l'apparence, l'odeur, la saveur ; leur faible coût et leur abondance et leur renouvelabilité annuelle (Rhim et Perry, 2007).

II. 3. Définition du film comestible

Un film comestible peut se définir comme étant une fine couche de matériaux comestibles (protéines, polysaccharides et lipides) formée à la surface d'un aliment sous forme d'enrobage ou placée sur ou entre les différents composants d'un aliment (Krochta et De MuIder-Johnston, 1997).

Les films comestibles font partie intégrante du produit enrobé et sont consommés en même temps que le produit et par conséquent, doivent avoir des propriétés sensorielles neutres (compatible avec le produit), pour ne pas être détectés lors de la consommation (Cuq et al., 1995; Guilbert et al., 1997). Ils protègent le produit de l'environnement ou des autres composants de l'aliment (dans le cas de produit non filmogène). Ils augmentent ainsi sa durée de vie en agissant comme une barrière aux gaz, à l'humidité et auxmatières grasses. Les films comestibles forment un sous-groupe des films biodégradables (biofilms) qui se définissent comme étant une fine couche de matériaux complètement dégradable par les microorganismes en composés naturels**.**

Les films comestibles jouent un r6le important sur la stabilité des produits alimentaires. Ils permettent en effet d'augmenter la qualité des produits emballés en diminuant les pertes d'arômes, en préservant le goût, la texture et en améliorant l'apparence. Ils induisent aussi une augmentation de leur durée de vie et de leur conservation et favorisent le maintien de la qualité des aliments même après ouverture. Les films comestibles peuvent en effet protéger les produits de l'humidité et peuvent former des barrières aux gaz et auxsolutés dans le cas de produits hétérogènes (Peyron, 1991).

Les composés les plus souvent utilisés pour la formation des films ou d'enrobages comestibles dans le domaine de la conservation des aliments se divisent en trois (03) catégories : les hydrocolloïdes, les lipides, et les composés (composites).

-Les hydrocolloïdes sont représentés par les protéines (kératine, caséine, zein de maïs, gluten de blé, protéine de lactosérum et de collagène) et par les polysaccharides (dérivé cellulosique, dérivé d'amidon, alginate, pectine, carragénine, gommes arabiques et chitosane).

- Les lipides sont principalement constitués par les cires, acides gras.

- Les composés (composites) sont un mélange d'hydrocolloïdes et de lipides. Les films composites peuvent exister sous forme d'une ou double couche et/ou sous forme d'émulsion. Baldwin et al.(1955), ont montré que les enrobages à base de polysaccharide sont très efficaces pour la conservation des fruits et légumes fiais. ce

sont des polymères très disponibles, peu coûteux, non toxiques et biodégradables (Arai et al., 1968, Whistler, 1991). Ils possèdent de très bonnes propriétés filmogènes et sont principalement utilisés comme agent stabilisant, épaississant et gélifiant (Gliskman, 1982). De plus, ces films sont clairs, résistants, flexibles. Ils ont une perméabilité sélective à l'oxygène et au dioxyde de carbone, ce qui favorise un meilleur contrôle de l'atmosphère interne du hit durant le stockage et la distribution (Sandford, 1989 ; Peyron, 1991 ; Kaplan et al., 1993).La perméabilité sélective de ces polysaccharides au dioxyde de carbone et l'oxygène résulte en un ralentissement de la respiration des fruits et légumes. Ceci a pour effet d'augmenté la durée de vie sans toutefois engendrer de conditions anaérobies qui entraînent un désordre physiologique et une baisse rapide de la qualité. L'idée dans tous les cas est de créer une atmosphère modifiée dans le produit avec un emballage totalement biodégradable.

II. 4. Paramètres influençant les propriétés fonctionnelles des films comestibles

II. 4. 1. Influence du plastifiant

Afin de préserver les propriétés barrières des films et enrobages comestibles, leur résistance mécanique et leur déformabilité sont nécessaires et recherchées. En effet, les enrobages doivent supporter des contraintes mécaniques d'origines diverses: manipulation, transport, gonflement du produit sur lequel ils sont déposés, etc. C'est pourquoi il est généralement préférable d'avoir un emballage déformable plutôt que très rigide qui est donc cassant. Pour cela, il est généralementnécessaire d'ajouter des plastifiants dans leur formulation, en particulier dans les films à base de protéines, et de façon moindre pour les films polysaccharidiques. Un plastifiant est une petite molécule peu volatile dont l'addition entraîne une diminution des forces intermoléculaires et une augmentation de volume libre et de la mobilité des chaînes. Ils modifient les propriétés fonctionnelles des films avec en général une diminution de la résistance, de la rigidité et des propriétés barrière, et une augmentation de la flexibilité et de l'élongation maximale. Différentes études ont montré que les films protéiques sont beaucoup plus sensibles aux plastifiants que les films polysaccharidiques (Gennadios et al., 1994 ; Cuq et al., 1996 ; Debeaufort et al., 1994). Lesplastifiants sont des additifs utilisés pour améliorer la flexibilité ou la plasticité des polymères et, occasionnellement, ils sont utilisés pour faciliter le processus de la mise en forme d'un polymère(Daniel, 1989).

Certaines théories ont été proposées pour expliquer les mécanismes de l'action des plastifiants (Verrier, 2005):

1. La théorie de la lubrification: postule que le plastifiant, par insertion entre deux chaînes de polymères, réduit les interactions intermoléculaires ;
2. La théorie de gels: postule que le plastifiant, dans un réseau provenant d'une structure tridimensionnelle rigide, brise un certain nombre d'interactions intermoléculaires en masquant les centres de forces attractives et en solvatant partiellement les chaînes de polymères en ces points (Fig.II. 1).

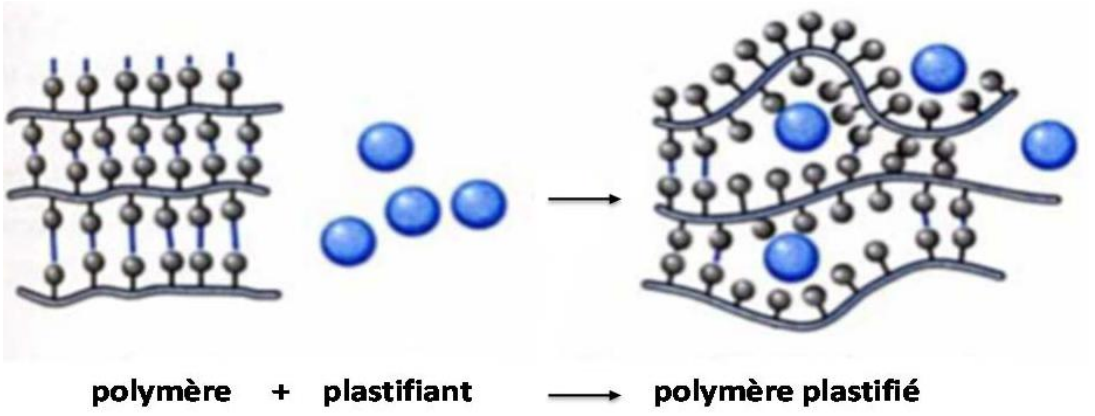


Fig.II. 1. Schématisation du mécanisme de plastification à l'échelle moléculaire (d'après Trotignon et al., 1996)

II. 4. 2. Influence de la concentration en eau et du gradient d'humidité relative

L'augmentation du différentiel d'humidité relative engendre une augmentation de la perméabilité à la vapeur d'eau. De plus, pour un différentiel d'humidité relative constant, l'augmentation de la valeur moyenne de l'a_w induit une augmentation de la perméabilité à la vapeur d'eau (Koelsch et Labuza, 1992; Gontard et al., 1993; Fennema et al., 1994). Pour les films hydrophiles tel que les films à base d'hydrocolloïdes, la perméabilité à la vapeur d'eau dépend de la différence d'humidité relative et de l'humidité absolue (Han, 2005). Benbettaieb et al.(2014) ont étudié l'effet de la variation de gradient d'humidité relative (30-75, 30-84 et 30-100%) sur la perméabilité à la vapeur d'eau de film mélange chitosane-gélatine. Ils ont montré que pour une même épaisseur de film, la perméabilité augmente linéairement avec le gradient d'humidité. Elle augmente de 14 % lorsque le gradient varie de 30-75 à 30-84, et de 58% lorsqu'il passe à 30-100%. À une valeur importante d'humidité

relative, la teneur en eau dans le film augmente et le film sera plus plastifié par l'eau. Donc les mobilités des chaines augmentent, et par conséquent la diffusivité de l'eau augmente. Kokoszka et al. (2010a et 2010b) ont montré aussi que la plastification du réseau protéique avec l'eau influe sur le transport de la vapeur d'eau à travers les films et ce transfert est plus prononcé quand le gradient d'humidité relative est important. Des résultats similaires ont été démontrés par Talija et al. (2008) et Phan et al. (2009b) sur des films à base de polysaccharides. Ces auteurs ont montré que les propriétés barrière à l'eau sont largement influencées par le gradientd'humidité relative environnant.

II. 4. 3. Influence de l'épaisseur des films

De nombreux auteurs ont observé une diminution exponentielle du coefficient de transfert d'eau lorsque l'épaisseur augmente, ce qui se traduit par une perméabilité apparente d'autant plus élevéeque l'épaisseur est faible (Debeaufort et al., 1993; Cuq et al.,1996; Quezada-gallo, 1999). Ce phénomène est beaucoup plus marqué pour les enrobages hydrophiles. Il existe cependant une valeur critique de l'épaisseur au-delà de laquelle le flux de vapeur d'eau diminue linéairement lorsque l'épaisseur augmente. Cette valeur est de l'ordre 30 à 60 μm pour les films à base de polyosides (dérivés de cellulose) ou de protéines (caséines, protéines myofibrillaires de poisson).

II. 5. Films à base de polysaccharides

Les films à base de polysaccharides, aussi appelés films à base d'hydrates de carbone, sont des polymères hydrophiles et présentent donc de très faibles propriétés barrières à l'humidité (Rhim et Perry, 2007). Une variété de polysaccharides et leurs dérivés ont été utilisés comme matrices filmogènes biodégradables. Ils comprennent l'amidon et ses dérivés, la cellulose et ses dérivés, les alginates, les pectines, le carraghénane, le chitosane et divers gommes (Kester et Fennema, 1986 ; Krochta et De Mulder-Johnston, 1997). La plupart des efforts pour améliorer les propriétés de ces films ont été, à l'origine, consacrée à la cellulose et à l'amidon. En tant que biopolymères, ces polysaccharides sont d'un intérêt primordial en raison de leur disponibilité et de leur coût relativement faible, mais la faible élasticité de ces matériaux est un inconvénient important qui limite leur application. Le mécanisme majeur de formation de films à base de polysaccharides est la rupture des segments polymères et la reformation des chaînes polymères dans la matrice filmogène ou dans le gel par évaporation d'un solvant et création de liaisons hydrogène.

II. 5. 1.Mise en forme des films

Deux technologies de base, à savoir les procédés par voie sèche et les procédés par voie humide, sont utilisées pour la préparation de films à base de biopolymères.

II. 5. 1.1. Procédés par voie sèche

Ces procédés sont basés sur les propriétés thermoplastiques de certains biopolymères. En effet, certains biopolymères manifestent un comportement thermoplastique, c'est-à-dire qu'ils peuvent, comme les polymères synthétiques thermoplastiques, être fondus de manière réversible. Les biopolymères thermoplastiques dans des conditions de faible teneur en humidité sont chauffés au-dessus de leur température de transition vitreuse par des méthodes d'extrusion ou de thermo-compression (Cuq et al., 1997). Le chauffage des polymères amorphes au-dessus de leur température de transition vitreuse les fait passer dans un état mou et caoutchouteux, ce qui permet de former des films après refroidissement. Principalement des films à base d'amidon et de protéines ont été traités par voie sèche. Certaines protéines ayant un comportement thermoplastique peuvent être traitées par ce procédé sans traitement supplémentaire, mais d'autres protéines et l'amidon doivent être plastifié avant traitement. Les procédés par voie sèche ont été principalement appliqués à la préparation de biomatériaux d'emballage avec de l'amidon et des protéines plastifiés en utilisant des techniques de traitement classiques tels que le moulage par extrusion, la compression et l'injection (Chandra et Rustgi, 1998). L'extrusion de biopolymères est la méthode préférée pour la production à haut débit destinée à des applications telles que l'emballage. La méthode de thermo-compression est également utile en tant que méthode de traitement en raison de sa simplicité et sa capacité de produire des films sans solubilisation. La thermo-compression est une technologie qui permet d'assembler des matériaux hétérogènes sous l'action simultanée de la température et de la pression sans qu'aucune phase liquide ne se forme au cours du processus d'assemblage, le tout dans une atmosphère variable selon les cas. Dans ces procédés, l'énergie mécanique spécifique, l'impact de cisaillement, la pression, le plastifiant, le temps et la température sont des paramètres importants pour déterminer les propriétés du film. Bien que les procédés par voie sèche nécessitent plus de matériel, ils ont quelques avantages majeurs par rapport à la voie humide: ils sont plus proches de l'implémentation industrielle et ils diminuent considérablement la solubilité des films obtenus par la création d'un réseau hautement réticulé de film (Rhim et Perry, 2007).

II.5. 1. 2. Procédés par voie humide

Différents procédés existent pour réaliser des films par voie humide. La méthode du « casting » ou méthode de coulée - évaporation du solvant, est basée sur le séchage de la solution filmogène. Elle comprend la solubilisation, la coulée et le séchage. La première étape consiste à préparer une solution filmogène par dissolution d'un biopolymère dans un solvant approprié tel que l'eau, l'alcool, ou un solvant organique. La solution est ensuite coulée dans un moule anti-adhérent et évaporée à température ambiante ou à des températures élevées. La formation effective d'un film cohésif dépend de la nature, du type et de l'ampleur des interactions des polymères impliqués ainsi que des conditions de formation de film telles que la température et la vitesse de séchage, la teneur en humidité, le type de solvant, la concentration du plastifiant et le pH. La méthode du casting a été couramment utilisée pour la préparation de films à base de biopolymères. D'autres méthodes telles que le « dipping » et le « spraying » permettent d'élaborer des films à base de biopolymères par voie humide. Le dipping ou méthode par trempage est utilisé pour appliquer un film protecteur sur certains aliments (Greener et Fennema, 1994), ou sur des produits techniques comme certaines céramiques (Santacruz et al., 2004). Cette technique est également utilisée pour la fabrication des gélules pharmaceutiques dures (Podczeck et Jones, 2004). L'objet à revêtir est trempé dans une solution de manière à former une couche gélifiée uniforme sur la surface de l'objet. Une fois l'épaisseur désirée atteinte, l'objet est retirée de la solution, puis séchée. Le spraying consiste à pulvériser sur une surface une solution de polymère sous forme de gouttelettes afin d'obtenir un film d'une épaisseur très fine.

Dans les emballages, les transferts de matière se produisent soit par flux capillaire dans les pores, les fissures au niveau de l'emballage lui-même et dans les zones de jonction et de fermeture, soit par les phénomènes de perméabilité ou de diffusion au travers de la membrane. De plus, le caractère hydrophile de l'amidon rend les matériaux à base d'amidon très dépendants des conditions dans lesquelles ils sont stockés.

II.5.2. Application du chitosane en tant que film d'emballage comestible et enrobage

L'application du chitosane, comme emballage alimentaire, est très prometteuse à cause de sa biocompatibilité, biodégradabilité et non toxicité. Le chitosane, possède aussi une activité antimicrobienne intrinsèque, inhibant la croissance d'une grande

variété de bactéries (Shahidi et al., 1999), des activités bactériostatiques (Möller et al., 2004), et des activités fongistatiques (Roller et Covill, 1999).

En outre, le chitosane est un excellent candidat pour la fabrication de film comestible. Le chitosane forme des films transparents et permet d'augmenter la durée de conservation de certains produits alimentaires (Aider, 2010). Agullo et al. (2003) ont étudié l'effet antimicrobien d'un film comestible de chitosane pour la conservation de pizza prêt à consommer. Ils ont démontré que le chitosane retardait la croissance de microorganismes *(Alternaria*sp, *Penicillium* sp.et *Cladosporium*sp.) responsables d'altérations de ce type de produit. Ainsi, Savage et al. (1994) ont rapporté que l'enrobage du chitosane peut réduire la putréfaction des pommes au-delà de 12 semaines. Une étudesur l'enrobage de chitosane pour inhiber le *Sclerotinia*dans les carottes (Cheah, 1997) a montré que la putréfaction est clairement réduite de 88% à 28% par l'enrobage de chitosan de concentration 2-4 %(w/v). Il a été démontré que le chitosane pouvait réduire le taux d'incorporation des additifs chimiques dans les produits alimentaires de manière très significative. Roller et al. (2002) ont montré qu'une combinaison entre le chitosane et des faibles doses de sulfites (170ppm) a permis de retarder significativement la croissance microbienne (3-4 log CFU/g) dans des saucisses comparativement à une concentration élevée (340ppm) de sulfites en absence du chitosane. La perméabilité sélective au CO_2 et à l'oxygène a été exploitée par plusieurs chercheurs pour des applications post récoltes. En effet, Bai et al.(1988) ont ainsi crées une atmosphère modifiée l'intérieur du produit enrobé pour prolonger la durée de conservation en favorisant la rétention du CO_2 plutôt que l'O_2. Par exemple, des morceaux de pommes enrobés par du chitosan ont un taux de brunissement enzymatique et une perte d'eau abaissés (Pennisi, 1992). La même observation a été faite avec des concombres, desfraises, des poivrons (El Ghaouth, 1992), de plus, la croissance fongique a été réduite de même. Jianget Li. (2001) ont montré que l'enrobage semi-perméable permet de retarder le vieillissement, le taux de respiration et la perte du poids.

II. 5. 3. Paramètres influençant les propriétés des films de chitosane

II. 5. 3.1. Degrésd'acétylation et masse molaire

Chen et Hwa.(1996) ont étudié l'effet des masses molaires du chitosane (240 à 410 kg/mol) sur les propriétés mécaniques et barrières des films. Plus la masse molaire du chitosane augmente, plus la contrainte à la rupture augmente et inversement la

perméabilité à la vapeur d'eau diminue. Ces résultats sont comparables à ceux de Sarasam et Madihally. (2005) qui ont comparé trois différentes gammes de masses molaires du chitosane (50-190 kg/mol ; 190-310 kg/mol ; > 310 kg/mol).

Quant au degré de désacétylation (DD) du chitosane, Wiles et al. (2000) ont étudié l'effet de trois degrés de désacétylation du chitosane (92 ; 84 ; 73 % DD) sur la perméabilité à la vapeur d'eau. Ils ont conclu qu'il n'y a pas d'effet significatif. Cependant, le DD du chitosane affecte beaucoup plus les propriétés antimicrobiennes des films de chitosane (l'activité antimicrobienne augmente avec le DD) que les propriétés mécaniques et barrière (Suyatma, 2006).

II. 5. 3. 2. Effet du plastifiant

La plastification du chitosane n'est que peu étudiée contrairement aux films à base d'amidon ou de protéines. Néanmoins, certains auteurs ont démontré l'efficacité de quelques plastifiants pour les films de chitosane. Butler et al. (1996) ont rapporté que l'élasticité des films de chitosane plastifiés avec le glycérol diminue après 12 semaines de stockage, alors que Caner et al.(1998) ont trouvé que ceux plastifiés avec le PEG (polyéthylène glycol) sont stables jusqu'à 9 semaines.

II. 5. 3. 3. Effet des conditions de séchage

Srinivasa et al. (2004) ont comparé différentes méthodes de séchage pour la préparation des films de chitosane: l'étuve conventionnelle (ovendrying), par infrarouge à 80, 90 et 100°C, et à l'ambiance (27°C). Les propriétés mécaniques (la contrainte à la rupture et l'élongation) des films de chitosane préparés à température ambiante sont plus performantes que celles des films préparés en étuves.Cependant, leurs propriétés barrières à la vapeur d'eau et à l'oxygène sont plus faibles lorsque les films sont séchés à température ambiante.

L'incorporation de substances hydrophobes conduit à l'élaboration de matériaux composites résistant aux transferts de vapeur d'eau (Jumaa*et al*., 2002 ; Fuentes *et al*., 2000).

Une autre étude menée par Wong *et al.* (1992) sur l'incorporation d'acides gras dans des solutions filmogènes de chitosane a montré qu'en fonction des acides gras utilisés, la perméabilité à la vapeur d'eau pouvait être diminuée, tout en augmentant celle à l'oxygène, du fait des différences morphologiques des films.

Le but de ce projet est de préparer un film (emballage) biodégradable (hydrophobe) présentant des propriétés antibactériennes favorisant son emploi dans l'emballage alimentaires.

III. 1. Matériel

La réalisation de ce travail a nécessité l'utilisation du matériel cité dans le tableau III. 1.

Tableau III. 1. Materiel et produits

Petit materiel	Appareillage	Produits
-Verrerie de laboratoire : Fioles jaugées,béchers, pipettes, verres frités, éprouvettes, erlenmeyer, spatule, boite Pétrie -Papier filtre. - Entonnoirs. - Passoire - tamis.	-Balance -Agitateur magnétique chauffant. - pH mètre. - Etuve - Spectroscopie FT-IR -viscosité	- Biomasse (résidus de carapaces de crevettes brutes) -Acide chlorhydrique (HCl) 1N - Hydroxyde de sodium (NaOH) -Acide acétique(CH_3COOH) -Acétone (C_3H_6O) - KH_2PO_4 - K_2HPO_4 . Huiled'olivedomestique. - Glycérol.

III.2.Préparation du chitosane à partir de déchets de crevette

III. 2. 1. La déminéralisation

La déminéralisation de la chitine s'effectue par la dispersion de la poudre de carapace de crevette sèche dans une solution d'acide chlorhydrique HCl 1N pour solubiliser les minéraux spécialement le carbonate de calcium. Le rapport du solide au solvant est 1:15 (w/v) c'est -à- dire (1g de biomasse pour 15 ml de HCl) à température ambiante sous agitation pendant 30 min. La réaction produit un dégagement de gaz carbonique.

A la fin de la réaction, on effectue un rinçage de la poudre de carapace avec de l'eau distillée jusqu' au pH neutre (pH =7), ensuite la poudre est mise dans l'étuve à 60°C pour séchage (Percot et al., 2003)

III. 2. 2. La désacétylation

La carapace déminéralisée est dispersée dans une solution de NaOH 40% à raison de (1 : 50) (w/v). Le mélange est incubé pendant 6semaines à 35°C, le mélange est ensuite refroidi à l'eau froide. Le chitosane est, enfin, collecté par filtration, lavé à l'eau distillé, jusqu'à la neutralité (pH =7) (Kaddouche, 2003).

III. 2. 3. La décoloration ou Blanchiment

L'objectif de la décoloration est l'élimination des colorants et les lipides résiduels ainsi que l'obtention d'une chitine blanche. Cette décoloration est effectuée en utilisant de l'acétone à raison de 1:10(w/v) à température ambiante sous agitation pendant 2 heures. A la fin de la réaction, la poudre est lavée jusqu'à pH neutre et séchée à température ambiante (No et al., 1989).

III. 3. Préparation de biofilms

Les biofilms sont préparés en utilisant les matériaux suivants : le glycérol(G), le chitosane (CS) et l'huile d'olive (HO). Ce choix se base sur la complémentarité de la propriété de CS d'un côté et sur la nécessité de remédier à leur faible ductilité avec un plastifiant (G) tout comme à leur faible hydrophobicité (HO).

On a adopté la méthode de synthèse très utilisées pour l'emballage ; la synthèse en solution (casting). Le chitosane a été utilisé pour former avec l'huile d'olive et glycérol des films, par voie solvant-casting.

Trois biofilms ont été préparés :

- Un biofilm témoin : chitosane (1%) ;
- Un biofilm mixte 1 : 30 ml de chitosane (1%) + 3 ml d'huile d'olive ;
- Un biofilm mixte2 : 40 ml de chitosane (1%) + 4 ml d'huile d'olive ;
- Un biofilm mixte3 :40 ml de chitosane (1%) +4ml d'huile d'olive+ 3 ml de glycérol.

Le glycérol est utilisé comme plastifiant des films. Tandis que, l'huile d'olive est utilisée pour tenter d'augmenter l'hydrophobicité des biofilms.

La préparation des biofilms consiste en la dissolution de 1g de chitosane dans 100ml d'une solution d'acide acétique à 1%. Après dissolution complète on a coulé 30 ml du chitosane (biofilm témoin) dans une boite de Pétri de diamètre 9cm et on a laissé séché à température ambiante pendant une semaine. Les biofilms mixte 1, 2 et 3 sont préparé de la même manière sauf que pour chaque biofilm on a ajouté les additifs suscités.

Après le séchage, les biofilms sont récupérés et caractérisés par spectroscopie infrarouge. Ainsi, pour chaque biofilm on a déterminé le pourcentage d'absorption et le pourcentage de dégradation.

III.4.Caractéristique physicochimique du chitosane et des biofilms préparés

III. 4. 1. Test de solubilité du chitosane

Le premier test de confirmation de la réussite de la désacétylation est le test de solubilité .Il est réalisé en mettant 1g du chitosane dans 100 ml de la solution d'acide acétique à 1% (Fig. III. 1).



Fig.III.1. Test de solubilité de chitosane

III. 4. 2. Analyse infrarouge IR

La méthode la plus simple qui nous permet de déterminer le degré de désacétylation et le degré d'acétylation des biopolymères chitineux est la spectroscopie infrarouge.

Les spectres infrarouge ont été obtenus en effectuant un balayage de 400à 4000 cm^{-1} du chitosane préparé dans des pastilles de KBr (1mg chitosane/100 mg KBr).Avant de prendre le spectre, l'échantillon a été étuvé à 50°C pendant 24 heures

III.4. 3. Viscosité et poids moléculaire de chitosane

Le poids moléculaire du chitosane préparé est calculé à partir de sa viscosité intrinsèque notée [η]en appliquant l'équation de Marque Houwink (Kasaai 2007) :

$[\eta]=kM^{a}$ ……(1)

ket a : sont de constantes.

pM : poids moléculaire (dalton).

La viscosité intrinsèque du chitosane est déterminée expérimentalement par un viscosimètre capillaire en utilisant un tube à vessie (fig.III.2).



Fig. III. 2. Viscosimètre capillaire en utilisant un tube a vessie

La méthode est basée sur la mesure du temps d'écoulement d'un même volume de solvant (l'acide acétique à 1%) ou de solution de chitosane contenu entre les deux points (a)et (b) à l'aide d'un chronomètre.

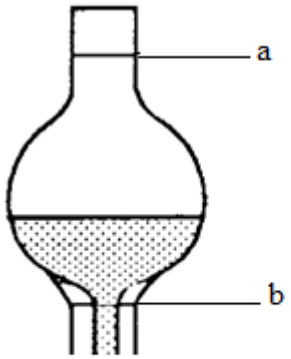


Fig.III. 3. Viscosimètre capillaire en utilisant un tube a vessie

Nous définissons la viscosité spécifique comme suit :

$[\eta_{sp}]=t–t_0/t_0$……(2)

t : le temps d'écoulement de la solution de chitosane de concentration C.

t_0 : le temps d'écoulement du solvant.

En divisant cette valeur par la concentration de la solution de chitosan (g /dl), on obtient ce que nous appelons la viscosité réduite :

$[\eta_{red}]=\eta_{sp}/C$ …….....(3)

Ainsi, pour différentes concentrations de chitosane (0,01 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,075 et 0,1g/dL), on obtient donc différentes valeurs de viscosité réduites. Le tracé des viscosités réduites en fonction des concentrations donne lieu à une droite dont l'ordonnée à l'origine est égale à la viscosité intrinsèque.

Quant aux valeurs des constantes a et k celles-ci dépend essentiellement du solvant utilisé en se référant à Rao qui a utilisé le même solvant, nous avons adopté la valeur 0.72 pour a et $4{,}74.10^{-5}$dl /g pour k (kasaai, 2007).

III. 4. 4. Caractérisations des biofilms

III. 4. 4. 1. Analyse infrarouge IR

La spectrométrie IR permet, également, par interprétation des spectres obtenus, de déceler les groupements fonctionnels contenus dans une molécule : alcool, aldéhyde, cétone, acide..., ainsi que les liaisons entre les carbones d'une chaîne (chaîne saturée, insaturée, caractère aromatique d'une molécule). Dans cet objectif, les biofilms préparés ont été analysés par FTIR pour déterminer leurs groupements fonctionnels.

III. 4. 4. 2. Absorption de l'eau (Bhuvaneshwary et al., 2009)

Les biofilms préparés sont trempés dans une solution de tampon phosphate pH=7,4 à température ambiante. Un fragment de poids connu est placé dans le tampon phosphate pendant 30 minutes.

Le poids, est déterminé après avoir éliminé l'excès d'eau. À l'aide d'un papier filtre, le film est immédiatement pesé. L'absorption de l'eau a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$AE = (m_f – m_i) / m_i \times 100$……..... ……(4)

Dont m_i et m_f sont respectivement la masse initiale et la masse finale des échantillons.

III. 4. 4. 3. La solubilité ou la dégradation (Bhuvaneshwary et al., 2009)

Est exprimé comme le pourcentage de matière sèche solubilisé après immersion dans l'eau, tampon phosphate et l'acide acétique pendant 24h à 25°C sous faible agitation. Après séchage jusqu'à poids constant, m_f est mesurée et on calcule :

Le pourcentage de solubilité = $(m_i - m_f) / m_f \times 100$…….....(5)

III. 4. 4. 4. Activité antibactérienne

Dans l'objectif de valoriser les biofilms préparés, on a tenté d'étudier leur activité antibactérienne selon le protocole suivant :

- Des suspensions bactériennes de DO (0.08- 0.1) de *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Rhizopus* ont été préparées ;

- Chaque suspension est ensemencée par écouvillonnage sur Muller- Hinton pour les bactéries et sur sabouraud pour les champignons ;

- des fragments de chaque biofilm préparé est déposé sur les boites de Pétri selon la figure III. 4, tel que :

* CH 30 :30 ml chitosane (1%), 3 ml huile d'olive ;

* CH40 : 40ml chitosane (1%), 4 ml huile d'olive ;

* CH : chitosane

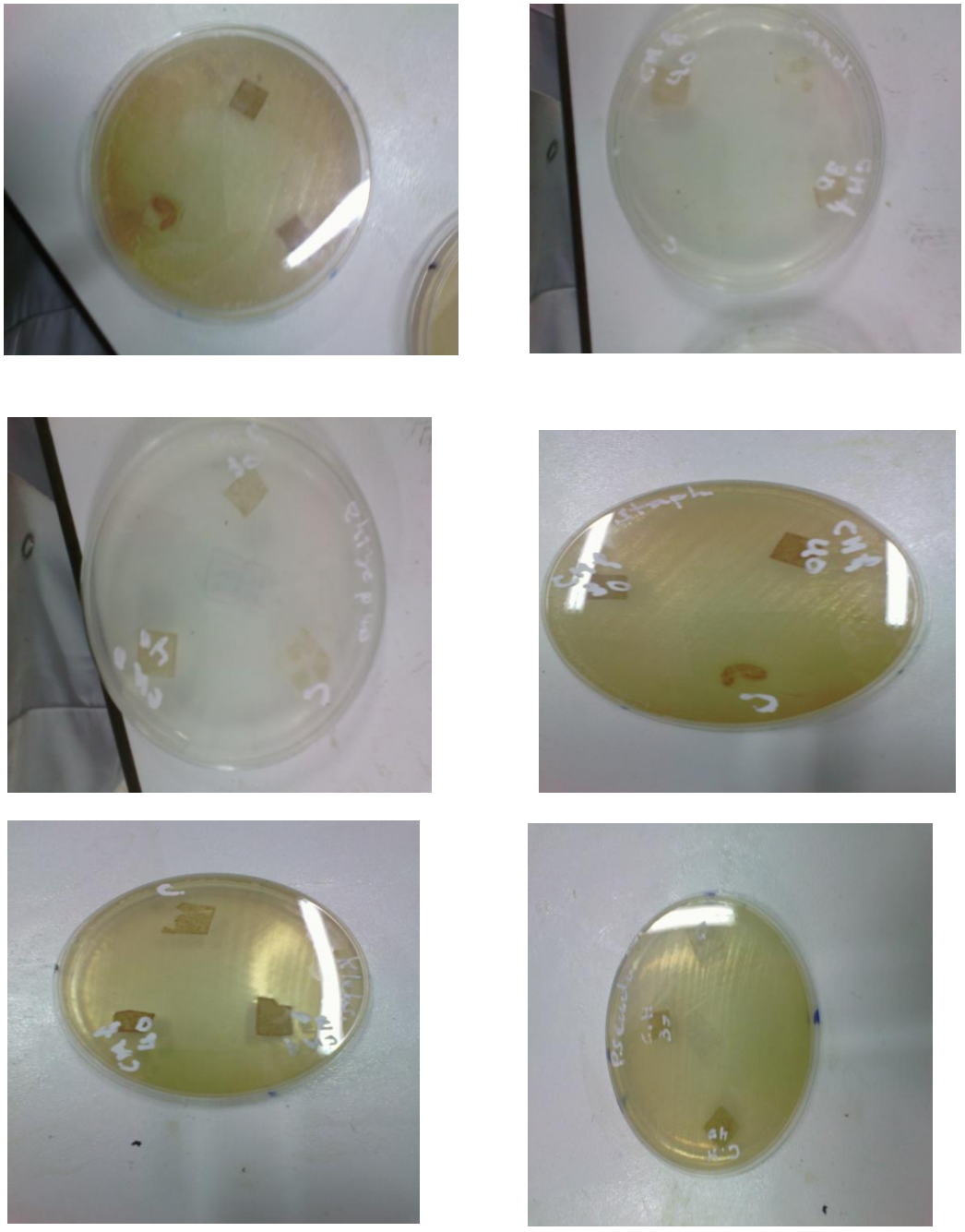


Fig.III. 4 . Etude de l'activité antimicrobienne des biofilms de chitosane, chitosane-huile d'olive sur *Candida albicans*

IV. 1. La quantité du chitosane produit

Les quantités et les rendements de la chitine et du chitosane obtenu sont présentés dans le tableau IV. 1.

Tableau IV. 1. La quantité et le rendement du chitosane préparé

Quantité de carapace (g)	200
Quantité du chitosane obtenu (g)	42
Rendement du chitosane/carapace (%)	21

Le tableau IV. 1, montre que la quantité du chitosane est de l'ordre de 42 g par apport à la carapace produite. Dont le rendement est de 21%.

IV. 2. Caractérisation du chitosane produit

IV. 2.1. Test de solubilité

Le premier test réalisé pour pouvoir déterminer les polymères qui peuvent être des chitosanes est le test de solubilité qui consiste à faire dissoudre 1g de la poudre traitée dans 100ml d'acide acétique à 1% (Roberts et Domszy, 1982).

Ce test a montré que le chitosane produit dans notre travail est 100% soluble dans la solution d'acide acétique à 1%.

IV. 2.2. Caractérisation par spectroscopie IR

IV. 2. 2. 1. Caractérisation du chitosane

L'analyse du chitosane par spectroscopie infrarouge nous a permis d'obtenir la figure IV. 1 et la figure IV. 2.

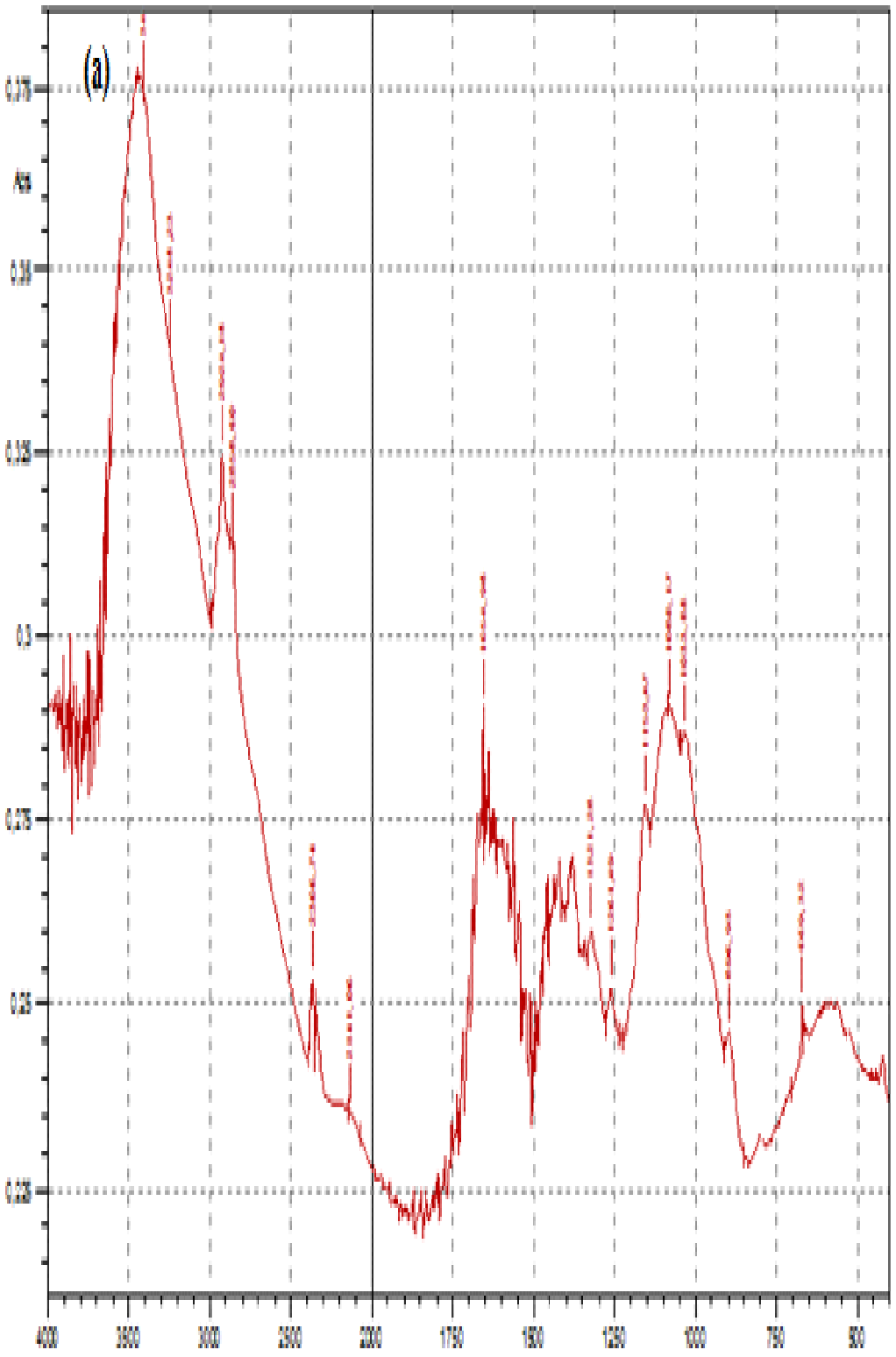


Fig. IV. 1. Spectre infra rouge du chitosane commercial

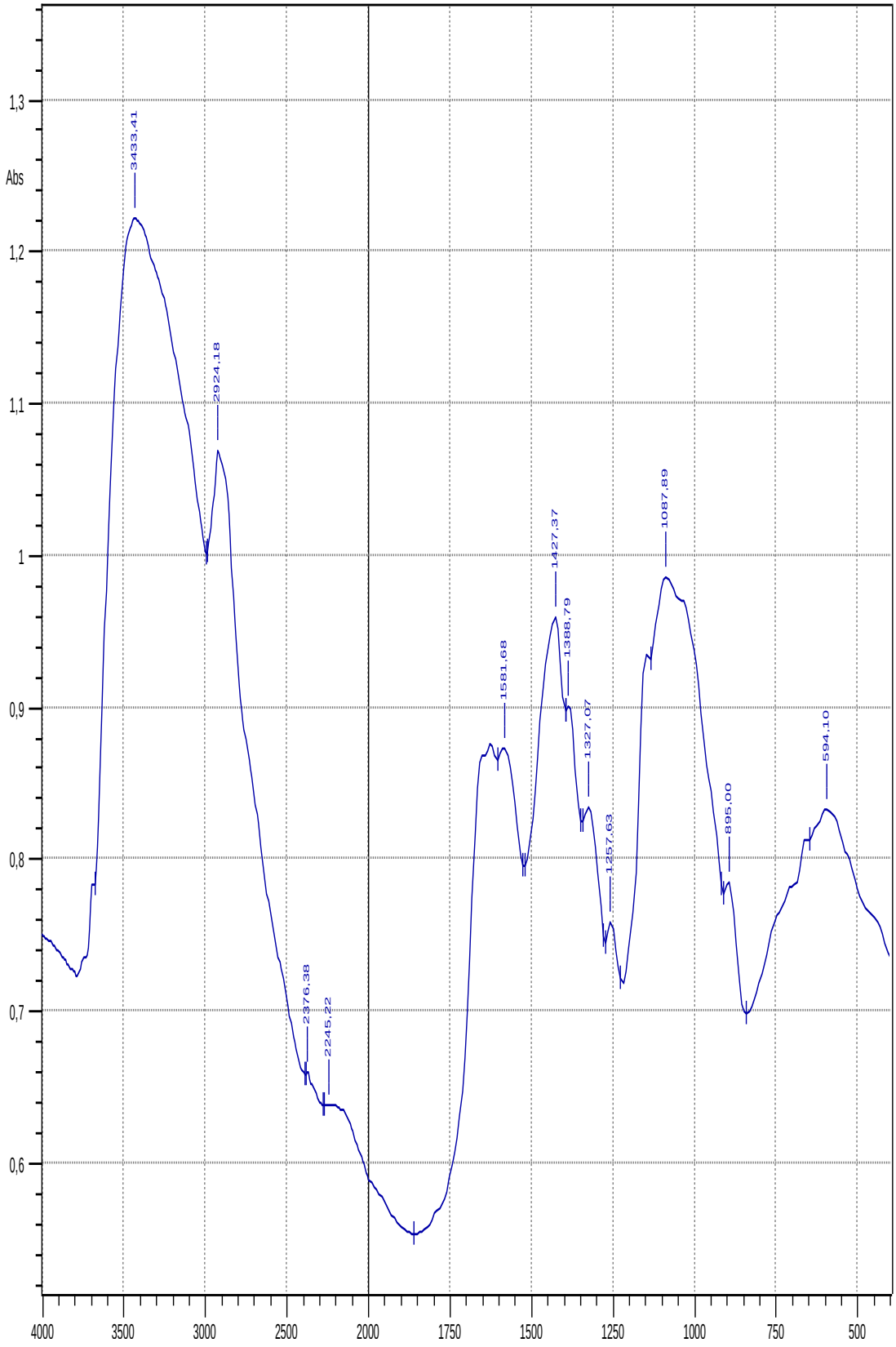


Fig. IV. 2. Spectre infra rouge du chitosane obtenu

Tableau IV.2. Les pics caractéristiques du chitosane

Longueur d'onde	Liaison
2924.18	O–H
2376.38	C–H
1427.37	C–H
1388.79	C–H
1327.07	O–H
1257.63	C–N
1087.89	C–O
895.00	C–H

Ce chitosane présente les bandes caractéristiques du chitosane à savoir une bande à 1315.50 [OH] cm^{-1}(1327.07 cm^{-1} pour notre chitosane) et 1419.66 cm^{-1}(1427.37 cm^{-1})(tableau IV.2) par contre la bande à 1627 cm^{-1} n'a pas bien apparu. Ainsi, l'absence du pic correspondant à la bande d'amide II à 1550 cm^{-1} prouve bien qu'il est désacétylé. L'analyse FT-IR permet de conclure que le chitosane obtenu présente une structure similaire à celle du chitosane commercial. La différence des bandes des pics obtenus est peut-être due à des impuretés ou à l'hydrolyse de la chaine de biopolymère.

IV. 2. 3. Détermination du poids moléculaire et de la viscosité du chitosane (crustacé)

Le poids moléculaire du chitosane a été calculé à partir de la viscosité intrinsèque notée [η] en appliquant l'équation de Marque-Houwink(equation2) ou k et a sont des constantes et M le poids moléculaire (Daltons)

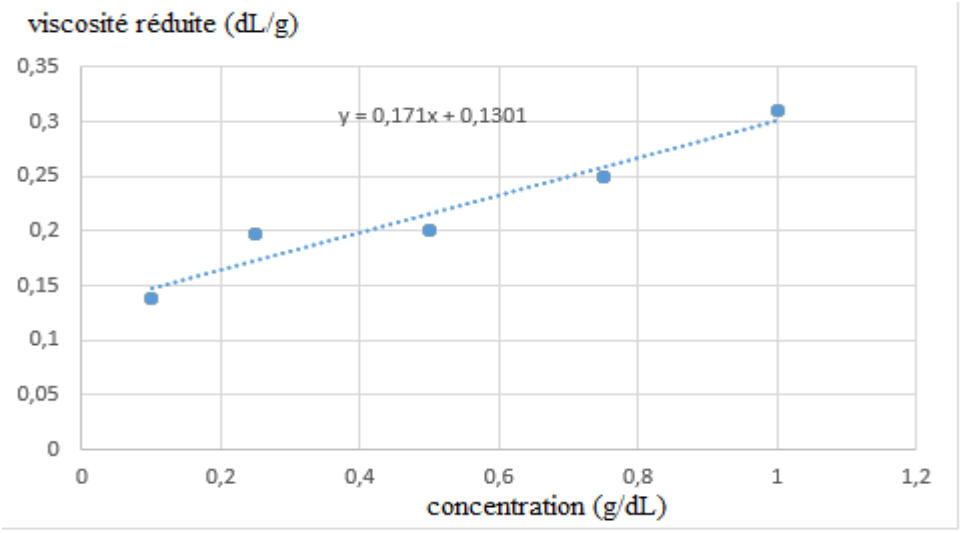


Fig. IV. 3. Evolution de la viscosité réduite en fonction de la teneur en chitosane à 30°C

L'ordonnée à l'origine de l'équation du graphique nous donne directement la valeur de la viscosité intrinsèque qui est de l'ordre de 0,1301dL/g (Fig. 3). En remplaçant la valeur de la viscosité intrinsèque dans l'équation (2) nous obtenons le poids moléculaire de notre échantillon qui est de l'ordre de 59.66 kDa. La valeur de poids moléculaire (PM) d'un chitosane dépend intimement du procédé de préparation, car celui-ci peut induire une dépolymérisation des chaines macromoléculaire et/ou une dégradation lors de sa production (Kaddouche, 2013).

Comparé à d'autres échantillons cités dans la littérature (Gupta et Jabrail, 2006), cet échantillon a un poids moléculaire relativement faible. Ce- ci est due probablement à une dégradation de la chaine polymérique à cause de temps élevé (6 semaines) de désacétylation.

III. 2. 2. 2. Caractérisation des biofilms du chitosane et les biofilms composites

Le biofilmdu chitosane obtenu est présenté dans la figure IV. 4. On remarque que c'est un biofilm transparent et un peu rigide.

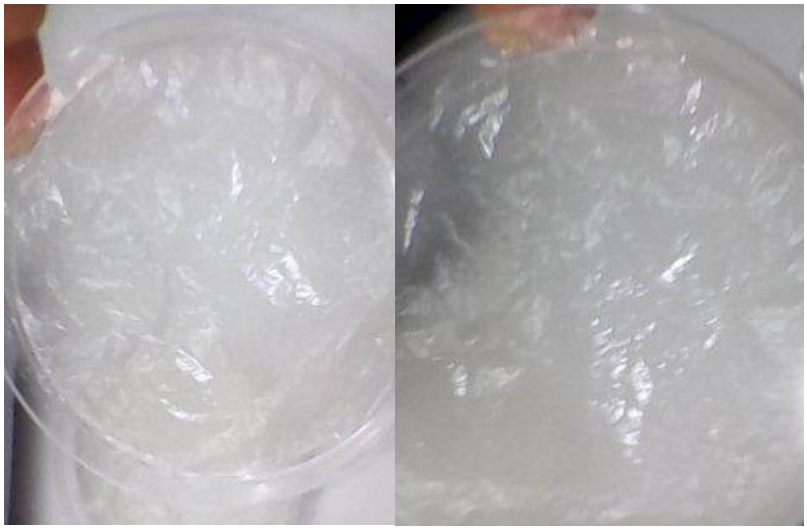


Fig. IV. 4. Les biofilms du chitosane

Par contre le mélange chitosane-huile d'olive-glycérol (figure IV. 5) n'a pas contribué à la formation de biofilm à cause du solvant qui ne s'est pas évaporé.

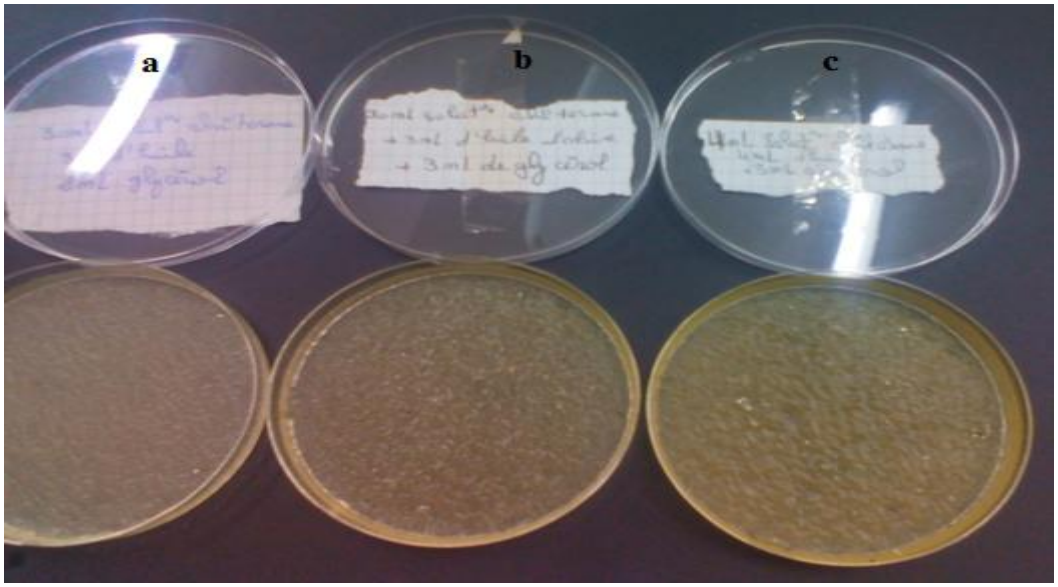


Fig. IV. 5. Les biofilms (chitosane- huiled 'olive- glycérol) (a) 30 ml chitosane (1%), 3 ml huile d'olive, 2 ml glycérol (b) 30ml chitosane (1%), 3 ml huile d'olive, 3 ml glycérol (c) 40 ml chitosane (1%), 4 ml huile d'olive, 3 ml glycérol

Tandis que le mélange (chitosane- huile d'olive) a donné un biofilm opaque avec une souplesse et une élasticité meilleure que celle de biofilm de chitosane. Ceci est peut-être dû aux liaisons hydrophobes établies entre le chitosane et l'huile d'olive (Fig. IV.6).

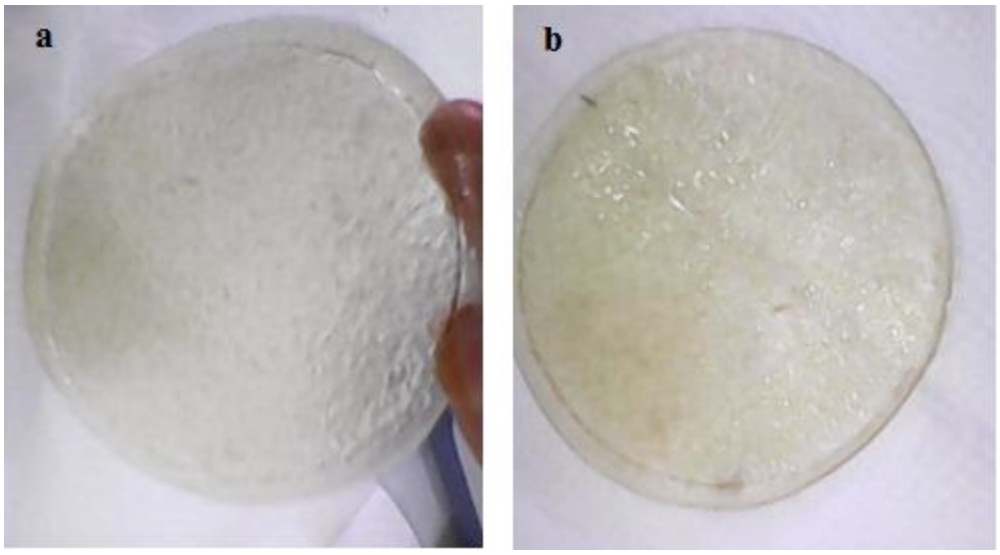


Fig. IV. 6. Les biofilms (a) 30ml chitosane (1%), 3mlhuile d'olive (b) 40ml chitosane (1%), 4 ml huile d'olive

a) Par spectroscopie infrarouge

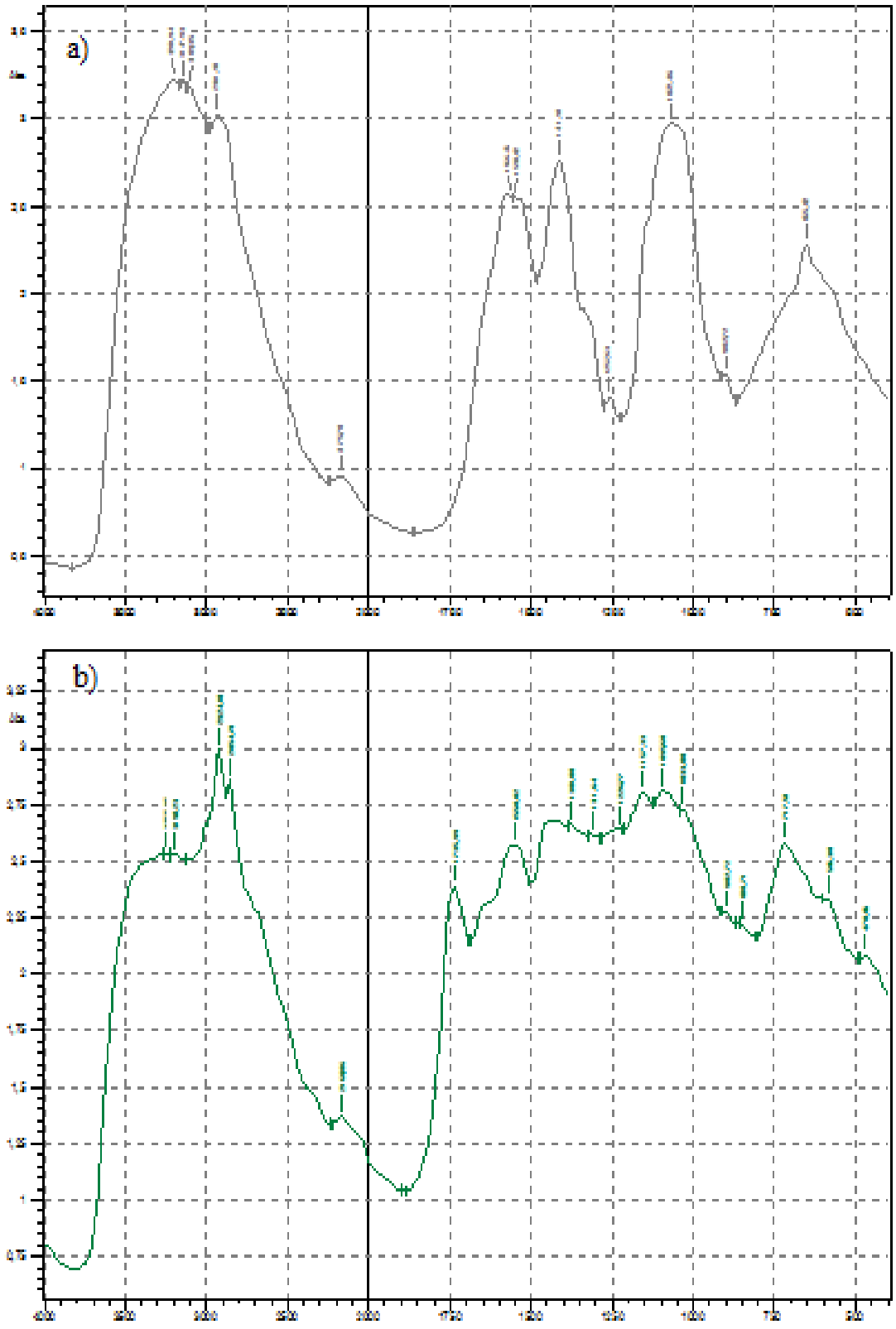


Fig.IV.7.spectre infrarouge de biofilim de (a) chitosane (b) chitosan+ huile d olive

La figure IV. 7. présente le spectre infrarouge de biofilm du chitosane et chitosane-huile d'olive. On remarque qu'il y a apparition et disparition de certains pics. Ceci est dû à la combinaison et l'implication de certains groupements tels que les groupements amines dans de nouvelles liaisons chimiques établies entre le chitosane et les groupements fonctionnels des constituants de l'huile d'olive.

b) Absorption de l'eau

Les biofilms du chitosane et chitosane- huile d'olive préparés sont trempés dans une solution de tampon phosphate pH=7,4 à température ambiante pendant 30 min dans le but de déterminer la capacité de ces biofilms à absorber l'eau. Les résultats obtenus montrent que le biofilm du chitosane a une absorption de 66% qui est nettement supérieure à celle du biofilm chitosane- huile d'olive qui est de 50%. Ceci peut être expliqué par l'hydrophobicité du biofilm chitosane- huile d'olive. Cette propriété est forte intéressante car dans le cas où on veut l'utiliser dans l'enrobage des fruits il permet de préserver l'eau contenant dans le fruit et par conséquent il préserve sa structure et sa texture.

c) La solubilité

Est exprimé comme le pourcentage de matière sèche solubilisé après immersion dans l'eau pendant 24h à 25°C sous faible agitation. Le résultat obtenu a montré que les biofilms préparés sont insoluble dans l'eau. Et ça c'est une propriété caractéristique du chitosane qui est insoluble dans l'eau.

d) L'activité antimicrobienne

L'étude de l'activité antimicrobienne des biofilms de chitosane contre les souches bactériennes et fongiques choisies a montré que les biofilms obtenus (chitosane et chitosane- huile d'olive) n'ont aucun effet sur les souches pathogènes choisies (Fig. IV. 8). Ceci est peut-être dû au fait que le chitosane préparé dans notre travail a un poids moléculaire faible puisque l'activité antimicrobienne du chitosane dépend de plusieurs facteurs tels le poids moléculaire, le degré désacétylation, le pH et la température.

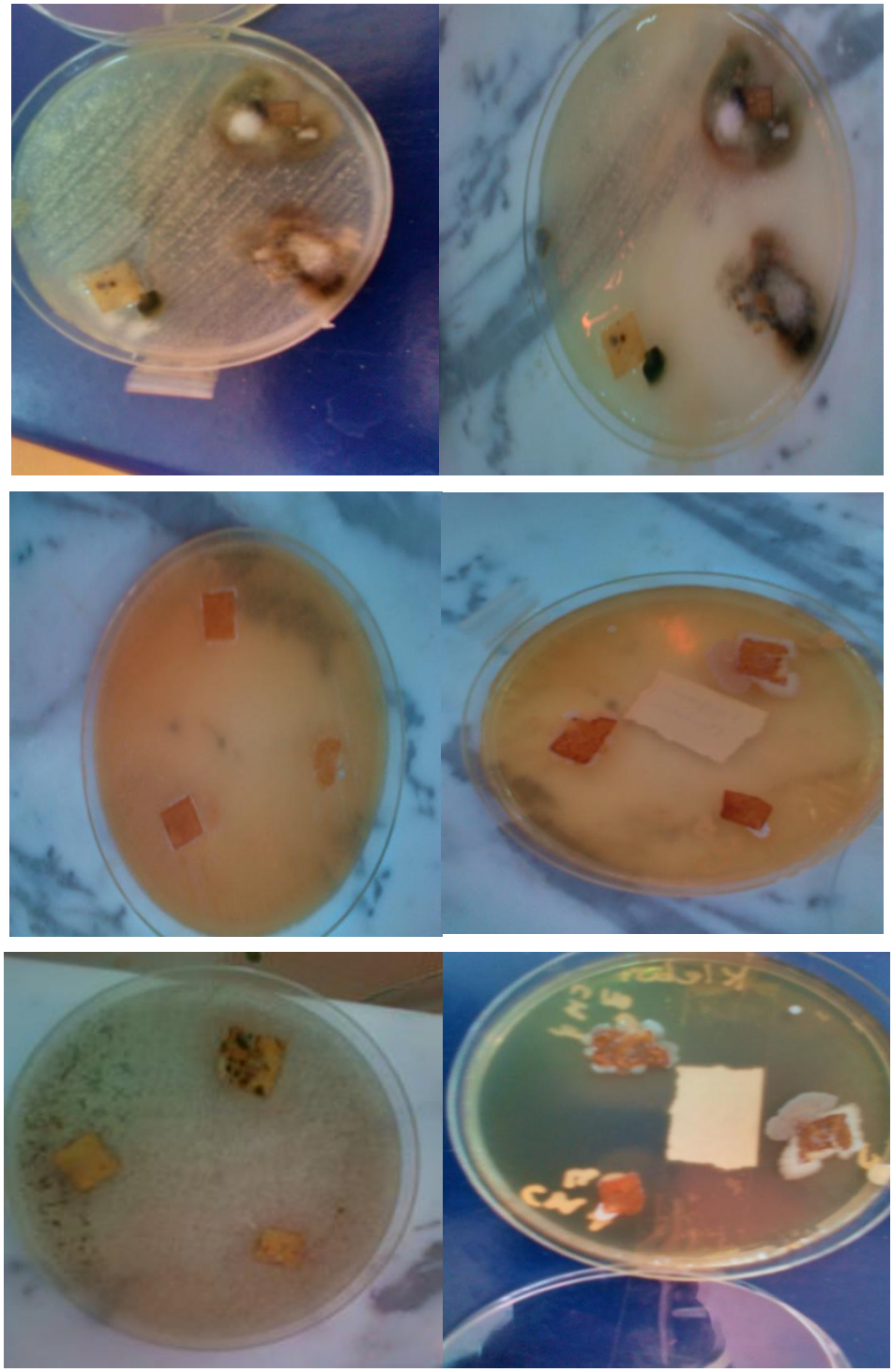


Fig. IV.8. Absence de l'activité antimicrobienne des biofilms de chitosane, chitosane-huiled'olive sur *Candida albicans*

L'objectif de ce travail est la préparation d'un biopolymère, le chitosan, à partir duquel on a préparé des biofilms pur (chitosane seul) et un biofilm composite (chitosane- huile d'olive, chitosane- huile d'olive- glycérol).

La première étape de notre travail a porté sur la préparation de chitosane à partir de carapace de crevette. Le rendement de production était de 21%. Le chitosane obtenu est soluble dans la solution d'acide acétique 1%. Son poids moléculaire est de 59.66 Kd avec une viscosité intrinsèque de 0,1301dL/g. L'analyse par spectroscopie infra-rouge a montré que le chitosane préparé au cours de notre travail présente un spectre IR et une structure similaire au chitosane commercial.

Dans la deuxième étape nous avons tenté de préparer trois biofilms : chitosane (1%), chitosane- huile d'olive, chitosane- huile d'olive- glycérol, par la méthode de casting. Le troisième mélange n'a pas donné de biofilm à cause d'une mauvaise évaporation du solvant. Le chitosane a donné un biofilm transparent et rigide, tandis que le biofilm chitosane- huile d'olive est opaque, souple et plus élastique.

L'analyse des biofilms obtenus par spectroscopie infrarouge a montré des spectres différents avec apparition et disparition de pics expliquant la formation de liaisons hydrophobes entre le chitosane et les constituants d'huile d'olive. L'étude de l'absorption de l'eau des biofilms a montré que l'absorption de l'eau par le biofilm de chitosane (66%) est nettement supérieure à celle du biofilm chitosane- huile d'olive (50%). Par contre, tous les biofilms préparés sont insoluble dans l'eau, tampon phosphate et l'acide acétique.

L'étude de l'activité antimicrobienne des biofilms préparés montrent que ces derniers n'ont aucun effet sur les souches microbiennes étudiées à savoir : *Pseudomonas aeruginosa, E. coli, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Rhizopus.* Ceci est peut être du au faible poids moléculaire du chitosane préparé.

Le manque de moyen nous a empêché de bien développer ce sujet intéressant qui s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche portant sur la préparation, caractérisation et application de biofilms à base de chitosane, donc en perspectives on propose de :

- Déterminer les propriétés mécaniques des biofilms ;
- Faire une application d'enrobage de fruits et étudier les échanges gazeux et l'évaporation de l'eau ;

  Etudier l'effet antimicrobien de façon plus approfondie par ce que c'est un volet très important à développer.

Aye, K.N., Stevens, W.F., Technical note improved chitin production by pretreatment of shrimp shells, Journal of chemical technology and biotechnology, 2004, 79, 421-425.

AmilaliMalek, 1999. Caractérisation des films de chitosane par la perméabilité à la vapeur d'eau et aux gaz (CO_2,O_2). Thèse de maitrise ès sciences. Université Laval.

Baldwin, E.A., Nisperos-carriedo, M.O., and Baker, R.A. 1995. Use of ediblecoating topreservequality of lightly (and slightly) processedproducts. CriticalReviews in FoodScience and Nutrition, 35 (6) : 509-523.

Bhuvaneshwari S.,Sruthi D., Sivasubramanian V., Niranjana K. and Sugunabai J., 2009.Development and characterization of chitosan film.International Journal of Engineering Research and Applications. Vol. 1, issue 2, pp. 292- 299.

El Ghaouth, A., Pomampalam, R., Castaigne, F.,and hl, J. 1992. Chitosancoating toextend the storage life of tomatoes. Hortscience. 27 (9) : 1016-1018.

Guilbert, S et Biquet, B., 1989. Les films et enrobages comestibles. Dans l'emballage desdenrées alimentaires de grande consommation (Chap 22). Bureau, G et Multon, J.L.(Ed.), Technique et Documentation Lavoisier. Paris, France.

Gamage, A. Shahidi, F., Use of chitosan for the removal of métal ion contaminants and protein from water. Food Chemistry, 2007, 104 (3), 989-996.

Gildberg, A., Stenberg, E., A new process for advanced utilization of shrimp waste, Process Biochemistry, 2001, 36, 809-812.

Kester, J. J. et O. R. Fennema 1986. Edible films and Coatings : Review, Food Tech., 40(1 2) :47-59.

Khan, T., Peh, K., Ch'ng, H.S. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. Journal of Pharmaceutical Science. 2002, 5 (3), 205-212.

Lévesque, M., Extraction de caractérisation de la chitine des résidus de la transformation industrielle des crustacés, Mémoire de maîtrise, Université Laval. 1995.

Lavall, R. L., Assis, O.B.G., Campana-Filho, S.P. P-Chitin from the pens of Loligo sp.:Extraction and characterization. Bioressource Technology, 2007, 98 (13), 2465-

.Muzzarelli, R.A.A., Chitin, Pergamom, Oxford, 1977.

No, H.K., Hur, E.Y. Control of Foam Formation by Antifoam during Demineralization of Crustacean Shell in Préparation of Chitin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1998. 46, 9. 3844-3846.

Mitra. S., Gaur, U., Ghosh, P.C., Maitra, A.N., Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. Journal of Controlled Release, 2001, 74 (1-3), 317-323.

No, H.K., Hur, E.Y. Control of Foam Formation by Antifoam during Demineralization of Crustacean Shell in Préparation of Chitin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1998. 46, 9. 3844-3846.

Percot, A., Viton, C, Domard, A., Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells, Biomacromolecules, 2002, 4 (1), 12-18.

Peyron, A. L'enballage et les produits filmogenes : Un nouveau mode d'enballage. Dans :La Viande Carné. 12 (2) Mars-Avril 199 1.

Percot, A., Viton, C, Domard, A., Characterization of shrimp shell deproteinization, Biomacromolecules, 2003, 4 (5), 1380-1385.

Poirier, M. Fractionnement et caractérisation de la chitine dans le système N,N-dimethylacétamide *1* chlorure de lithium, Mémoire de maîtrise, Université Laval, 2000. "

2472.

Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science. 2006,31,603-632.

Shanidi, F. Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.J. Food applications of chitin and chitosans. Food Science and Technology, 1999, 10, 37-51.

Synowiecki, J., Al-Khateeb, N., The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp Crangon crangon processing discards, Food Chemistry, 2000, 68, 147-152.

Synowiecki, J., Al-Khateeb, N., Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2003, 43 (2), 145-171.

Shahidi, F. and Synowiecki, J. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (Chinoecetes opilio) and shrimp (Pandalus borealis) processing discards. J. Agric. Food Chem. 1991, 39, 1527-1532.