



République Algérienne Démocratique Et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

## Projet de fin d'étude

Pour l'obtention du Diplôme de Docteur Vétérinaire

Thème :

# Extraction de la Chitine et préparation du chitosane à partir de la "sepia officinalis"

**Encadré par :**

Pr M. AISSI

**Présenté par :**

Mlle .Lassal Sarah

**Devant la commission de jury :**

Dr. HARHOURA  
Dr. TAIBI  
Dr. BOUHAMED  
Pr AISSI

Maitre de conférence à l'ENSV  
Maitre de conférence à l'ENSV  
Maitre de conférence à l'ENSV  
Professeur à l'ENSV

Président  
Examinatrice  
Examinatrice  
Promotrice

Samedi, le 28 Juin 2014

**37<sup>eme</sup> promotion**

# Remerciement

En premier lieu, je remercie ma promotrice, **Pr M.AISSI**, sans sa confiance ce sujet n'aurait jamais vu le jour.

Je remercie **Mr HARHOURA**, **M<sup>me</sup> TAIBI**, et **M<sup>me</sup> AMIRECH** de m'avoir fait l'honneur de constituer les membres de mon jury de soutenance.

Merci à **SIHEM** du laboratoire de microbiologie et **AMI HMED** du laboratoire de parasitologie à **HIBA** du laboratoire de chimie à l'**ENSV** qui m'ont aidé durant mon projet.

Merci à **M<sup>me</sup> AZZAG** pour ses précieux conseils.

Merci a **MERIEM** du laboratoire de cristallographie et cristallogénèse a l'**USTHB**.

Mercie a **YASSMINE** du laboratoire d'analyses fonctionnelles à l'**USTHB**.

Merci a **Mr DRARNI** du laboratoire de géologie à l'**USTHB**.

Merci a tous le personnel de la poissonnerie **SIKI** .

Et enfin merci à **MOH** d'avoir été là pour moi tout au long de mon projet.

# DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à tout ceux qui me sont chères ;  
**Mes parents et grands-parents** mon petit frère **ALI** et mes  
**deux sœurs, mes tentes, mes oncles** et tous ceux qui m'ont  
soutenu et épauler.

Spécialement mon grand ami **YACINE Nait Bachir** qui a  
toujours su faire preuve de beaucoup de patience et qui a été  
d'une grande aide pour l'aboutissement de ce travail , à **louiza**  
et à mes **amis** avec qui j'ai passé les plus belles années de fac,  
et qui ont été ma plus grande source d'énergie.

**SARAH**

# Sommaire

<b><u>INTRODUCTION GENERALE</u></b>	<b>1</b>
<b><u>PARTIE THEORIQUE :</u></b>	
<b><u>CHAPITRE I : LA SEICHE (<i>SEPIA OFFICINALIS</i>)</u></b>	<b>3</b>
<b>Introduction</b>	<b>3</b>
<b>I.1 Position systématique et diagnose</b>	<b>3</b>
I.1.1 Systématique	3
I.1.2 Diagnose	4
<b>I.2 Morphologie et anatomie</b>	<b>5</b>
<b>I.3 Locomotion et moyens de défense</b>	<b>8</b>
<b>I.4 Alimentation</b>	<b>9</b>
<b>I.5 Habitat et distribution géographique et Ecologie</b>	<b>9</b>
<b>I.6 Migration</b>	<b>10</b>
<b>I.7 Reproduction</b>	<b>11</b>
<b><u>CHAPITRE II : CHITINE ET CHITOSANE</u></b>	<b>13</b>
<b>Introduction</b>	<b>13</b>
<b>II.1 Historique</b>	<b>13</b>
<b>II.2 Chitine</b>	<b>13</b>
II.2.1. Structure chimique de la chitine	13
II.2.2. Source de la chitine	14
II.2.3. Préparation de la chitine	14
<b>II.3 Le chitosane</b>	<b>15</b>
II.3.1 Définition	15
II.3.2 Production de chitosane par désacétylation de la chitine	16
<b>II.4 Propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane</b>	<b>17</b>
II.4.1 Le Degré de Désacétylation (DD) ou le Degré d'Acétylation(DA)	<b>17</b>
II.4.2 La masse molaire	18
II.4.3 La solubilité	18
II.4.4 La viscosité	18

---

II.4.5 La structure cristalline de la chitine	19
II.4.6 La structure cristalline du chitosane	19
<b>II.5 Les applications de la chitine et du chitosane</b>	<b>19</b>
<b><u>PARTIE EXPERIMENTALE :</u></b>	
<b><u>CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES</u></b>	<b>24</b>
<b>III.1 Extraction de la chitine et préparation du chitosane</b>	<b>24</b>
III.1.1 Extraction de la chitine	26
III.1.2 Préparation du chitosane	29
<b>III.2 Caractérisation physicochimique</b>	<b>31</b>
III.2.1 Identification de la chitine par FTIR spectroscopie	31
III.2.2 Détermination du DA des chitosanes préparé	32
III.2.3 Détermination des caractères	32
III.2.4 Aisés de matière première selon la pharmacopée européenne, et étude de sa conformité à la formulation pharmaceutique et alimentaire	33
<b><u>Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS</u></b>	<b>35</b>
<b>IV.1 Extraction de la chitine et préparation du chitosane</b>	<b>35</b>
IV.1.1 Extraction de la chitine	35
IV.1.2 Préparation du chitosane	36
<b>IV.2 Caractérisation physicochimique</b>	<b>48</b>
IV.2.1 Identification de la chitine par FTIR spectroscopie	48
IV.2.2 Détermination du DA des chitosanes préparé	50
IV.2.3 Détermination des caractères	51
IV.2.4 Aisés de matière première selon la pharmacopée européenne, et étude de sa conformité à la formulation pharmaceutique et alimentaire	52
<b><u>CONCLUSION</u></b>	<b>53</b>
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b>	
<b><u>ANNEXE</u></b>	



Liste des abréviations :

**PT:** Prétraitement

**DM:** Déminéralisation

**DP:** Déprotéinisation

**MPPT:** Matière Première Prétraité

**ED:** extrait déminéralisé

**DA :** degré d'acétylation

**DD :** degré de déacétylation

**CHITI:** chitine

**CHIT 20:** chitosane a un degré de déacétylation de 20%

**CHIT 40:** chitosane a un degré de déacétylation de 40%

**CHIT 60:** chitosane a un degré de déacétylation de 60%

**CHIT 80:** chitosane a un degré de déacétylation de 80%

**CHIT 100:** chitosane a un degré de déacétylation de 100%

# Table des figures

Numéro	Titre	Page
I.1	<i>Sepia officinalis</i>	4
I.2	<i>Sepia officinalis</i> après capture	4
I.3	Schéma des caractéristiques fondamentales des seiches	5
I.4	Morphologie externe de la seiche, vue dorsale et ventrale	6
I.5	Coupe longitudinale de la seiche D'après	7
I.6	Vues ventrale et latérale d'un sépion de seiche	8
I.7	Distribution géographique de <i>Sepia officinalis</i>	10
I.8	Ponte de seiche	11
I.9	Œufs de seiche sous forme de grappe de raisin	12
II.1	Structure chimique de la chitine	13
II.2	Structure chimique du chitosane	16
II.3	Conversion de la chitine en chitosane par la désacétylation	16
II.4	Les unités de répétitions structurales de la chitine et du chitosane	17
III.1	photographie de la poissonnerie « fruits de mer chez SIKI frères ‘le petit port El-Djamila’ »	21
III.2	Spectrophotomètre infra rouge à transformée de fourrier	25
IV.1	Les endosquelettes de la sèche « <i>sépia officinalis</i> » avant prétraitement	27
IV.2	Les endosquelettes de la sèche « <i>sépia officinalis</i> » après prétraitement	27
IV.3		29
IV.4		30
IV.5		31
IV.6	les 8 différents extraits obtenus après déminéralisation.	32
IV.7		35
IV.8		36
IV.9		37

# **Introduction générale**

# Introduction générale

Depuis toujours la nature a été la source d'inspiration des scientifiques et le mystère le plus sombre qu'on n'arrive toujours pas à résoudre, les biomatériaux constituant le règne animal son à nos jours encore très peu exploiter par rapport a la difficulté de leurs extractions, séparations et identifications. La chitine est le biopolymère le plus abondant dans la nature après la cellulose, coexiste avec les protéines et les minéraux dans les exosquelettes de crustacées, des endosquelettes de céphalopodes, dans les cuticules des coléoptères et certains champignons.

Après la découverte de la chitine celle-ci n'a pas suscité l'intérêt des chercheurs par rapport à ces propriétés physicochimiques qui la rendait inexploitable (insolubilité dans les milieux aqueux ...) mais bien plus tard sa desacytilation a permis l'obtention du chitosane que lui a montré toutes les propriétés physico-chimiques désirables et rechercher par les industries modernes (industrie pharmaceutique, alimentaire ...) et biologiques (activité antimicrobienne , antioxydant , cicatrisante ...)

Participer au développement de la valorisation et la maitrises des procédés d'obtention de ces biomolécules est très d'actualité à cause de deux facteurs essentiels :

- Les propriétés physico-chimiques et biologiques de ce biomatériau qui sont jusqu'à nos jours très peu connu et qui présentent un champ de recherche encore très vierge, notamment dans le domaine du design thérapeutique et de la technologie alimentaire en raison de ses propriétés biocompatibles, biodégradables et non toxiques.
- L'aspect environnementale et protecteur en vers la nature et la planète qui sont entrain de ce détruire petit à petit par l'exploitation des énergies fossiles et l'utilisation de réacteurs chimiques pour les synthèses des matériaux plastiques et autres, donc en utilisant le chitosane nous allons participer à :
  - Exploiter des matrices naturelles qui sont considéré comme des déchets de l'homme.
  - Passer des principes actifs synthétiques vers le chitosane (le passage d'une solution de polyvinylpyrrolidone iodée à une suspension de chitosane qui a la même activité antiseptiques).

- Diminuer l'utilisation des matériaux synthétiques (plastiques) en allant vers des dérivés du chitosane (bioplastiques) diminution de la pollution par des matériaux lentement biodégradables.
- Diminuer l'utilisation des solvants organiques toxiques en substituant les matériaux insolubles dans les milieux aqueux par le chitosane qui est soluble.

L'intérêt vétérinaire de cette recherche est l'obtention d'une biomolécule ayant des activités biologiques (antifongique, antimicrobien, anti-infectieux) ; agent anti-tumoral; effet hémostatique; favorisation de la croissance du tissu ; stimulation de la prolifération des cellules.

La matrice que nous allons étudier est l'endosquelette de la seiche (*sepia officinalis*) qui est très peu étudiée par les chercheurs et pas encore exploité par l'industrie. Dans ce travail, nous allons commencer par l'optimisation de quelques paramètres d'extraction de la chitine par la méthode chimique en utilisant un premier plan factoriel pour l'étape de la déminéralisation et un second pour l'étape de deproteinisation ; ensuite une étude cinétique de la réaction de conversion de la chitine en chitosane va être effectuée afin de maîtriser cette réaction et donc la maîtrise du procédé de préparation du chitosane.

**Partie théorique :**

**Chapitre I :**  
**Etude de la matrice *Sépia officinalis***

## Introduction

Dans ce chapitre nous allons synthétiser les données bibliographiques concernant la matrice sur laquelle notre recherche s'est portée, qui est la seiche *Sepia officinalis*. Le nom seiche peut être utilisé pour toute espèce du genre *Sepia*, dans lequel *Sepia officinalis* est la plus commune<sup>1</sup>

### I.1 Position systématique et diagnose

La seiche commune est un mollusque appartenant à la classe des céphalopodes comme l'indique le tableau I. Les céphalopodes sont des animaux marins non segmentés et dépourvus d'appendices articulés. Leur corps est mou et généralement protégé par une coquille interne calcaire, secrétée par un repli cutané du corps, le manteau<sup>2</sup>. Ces animaux sont particulièrement évolués et représentent le sommet de l'évolution chez les mollusques. de cette manière, ils sont dotés d'un système nerveux développé contenu dans un cartilage céphalique et sont capables d'apprentissage<sup>3</sup>; en conséquence, même si les céphalopodes ont gardé des caractéristiques appartenant aux mollusques, certains mécanismes sont comparables à ceux des poissons<sup>4</sup>. De ce fait les céphalopodes sont étudiés pour de nombreuses raisons commerciales et scientifiques<sup>5</sup>.

#### I.1.1 Systématique

Éléments de classification	Position systématique
Règne	Animalia
Embranchement	Mollusca
Sous-embranchement	Conchifera
Classe	Cephalopoda
Sous-classe	Coleoidea
Super-ordre	Decapodiformes
Ordre	Sepiida
Famille	Sepiidae
Genre	<i>Sepia</i>
Espèce	<i>Sepia officinalis</i> , Linnaeus, 1758

Tableau I.1: Position systématique de *Sepia officinalis*<sup>6</sup>

### I.1.2 Diagnose

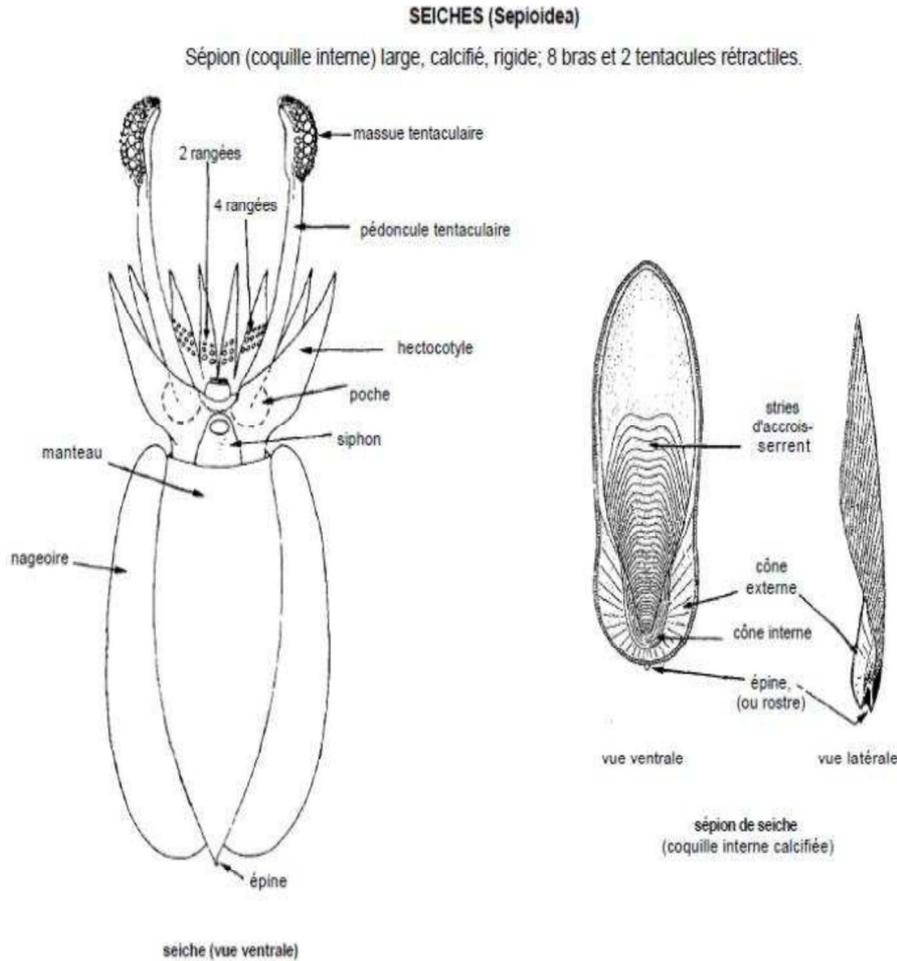
*Sepia officinalis* est un céphalopode qui peut atteindre 40 cm de long. Son corps, d'une couleur brunâtre variant suivant le milieu ambiant, est de forme ovale, assez large et aplati. Il est bordé depuis la tête jusqu'au bout par des replis natatoires qui ondulent lorsque la seiche se déplace ou qu'elle reste en position statique. La tête possède deux grands yeux dont l'iris à la forme d'un "W". La bouche (son bec) est entourée de dix tentacules, deux longs et huit courts, dont elle se sert pour chasser<sup>7</sup>.



Figure I. 1: photo *Sepia officinalis*<sup>8</sup>



Figure I.2: *Sepia officinalis* après capture



**Figure I.3: Schéma des caractéristiques fondamentales des seiches<sup>9</sup>**

## I.2 Morphologie et anatomie :

Le corps se compose de deux parties : la tête et le manteau. La tête est munie d'une couronne de 8 bras entourant la bouche (garnis de 5 à 6 ventouses dotées d'anneaux chitineux par ligne transversale ; sur leur face interne, la ventouse du milieu est légèrement plus large que les autres). Elle comprend également deux tentacules rétractiles dans les poches, garnies de ventouses seulement à leur extrémité (massue tentaculaire). Chez le mâle *Sepia officinalis*, le quatrième bras gauche est modifié (réduction des ventouses) en hectocotyle (organe permettant d'introduire les spermatophores dans la cavité palléale de la femelle lors de l'accouplement)<sup>10.La</sup> seiche porte latéralement deux grands yeux à pupille en W recouverts d'une membrane transparente. Le manteau, rayé, recouvre l'os calcaire ou sépion, coquille interne de ce mollusque. Ventralement, il recouvre la cavité palléale qui contient une paire de

branchies (le fait qu'il n'existe pas de canal branchial entre les vaisseaux afférents et efférents est caractéristique de l'ordre des Sepioidae), les émonctoires (anus, orifices urinaires) et l'orifice génital.

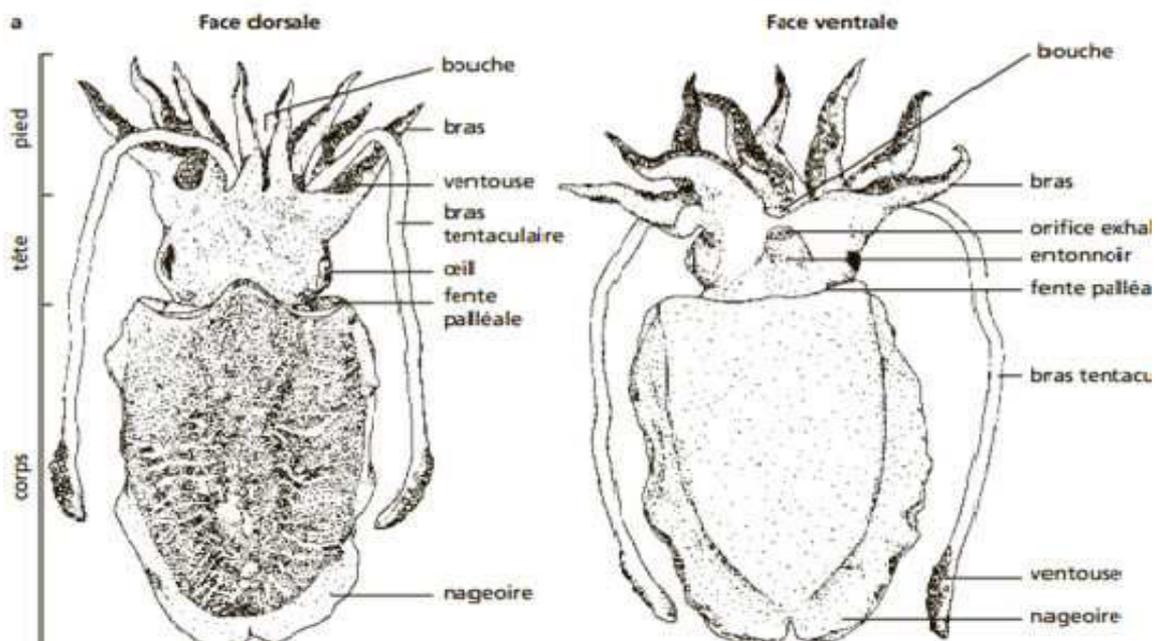
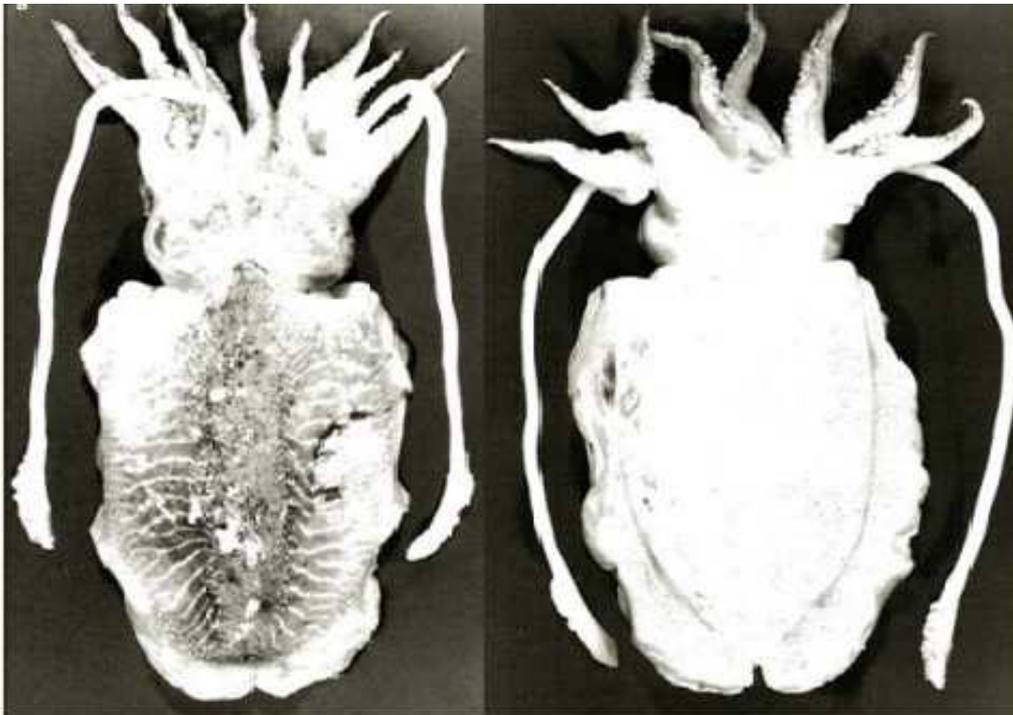
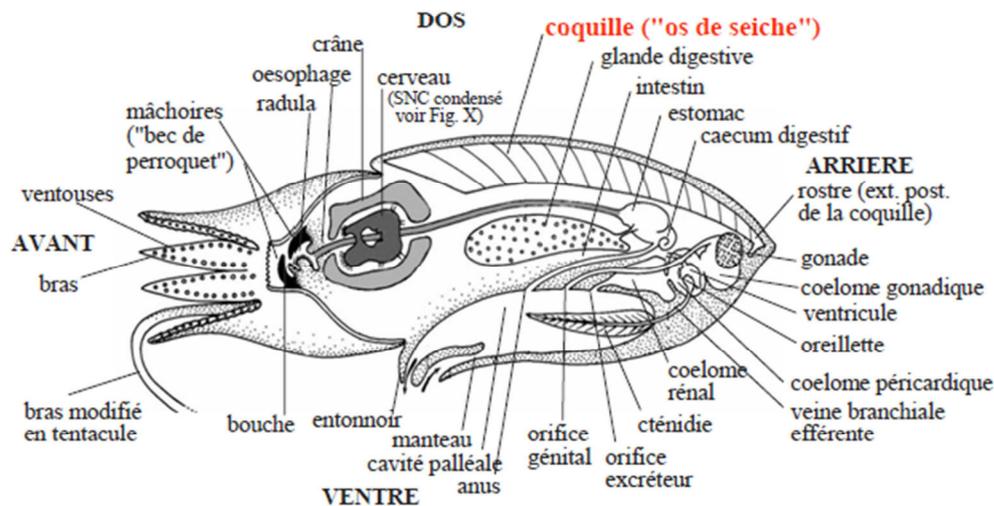


Figure I.4 : Morphologie externe de la seiche, vue dorsale et ventrale<sup>11</sup>



**Figure I.5 : Coupe longitudinale de la seiche D'après<sup>12</sup>**

Le manteau est bordé d'une nageoire sur presque toute sa longueur. Les ondulations de cette nageoire permettent à l'animal de se déplacer à une allure lente et lui assurent une grande manœuvrabilité. En cas de danger, un déplacement rapide dit "à réaction" est provoqué par de puissantes contractions du manteau : l'eau dans la cavité palléale est expulsée au niveau de la fente du manteau, l'entonnoir. Ce type de nage est également très utile lors de la chasse. La réaction de fuite est souvent accompagnée de l'expulsion d'encre (sécritée par la poche du noir). L'encre libérée dans le manteau est alors expulsée en même temps que l'eau. Il faut noter qu'en temps normal, seule la nageoire latérale est utilisée pour la locomotion, les contractions palléales ne servant qu'à faire circuler l'eau autour des branchies<sup>13</sup>.

Le sépion (os, coquille de seiche) est arrondi aux extrémités antérieure et postérieure, les bords latéraux étant parallèles. Le sépion est bordé d'une couche de chitine chez les adultes<sup>14</sup>. Il est constitué d'un assemblage de chambres calcaires remplies de gaz ou de liquide. Ces stries d'accroissement du sépion reflètent les conditions de nutrition et non l'âge de l'animal. Cet "os" représente 9,3 % du volume corporel. En jouant sur le rapport liquide/gaz par un système d'excrétion/pompage actif de  $\text{Ca}^{2+}$  contenu dans les loges, la seiche fait varier sa flottabilité, ce qui lui permet de balancer la pression extérieure et de se maintenir sans difficulté à une même profondeur. Le maximum de travail osmotique pouvant être réalisé est de 24 bars ; l'animal descend rarement en dessous de 200 m (21 bars). Quand à l'os, il est conçu pour pouvoir supporter une pression de 25 bars (soit 240 m environ de profondeur). C'est pourquoi les seiches ne fréquentent que des eaux relativement peu profondes

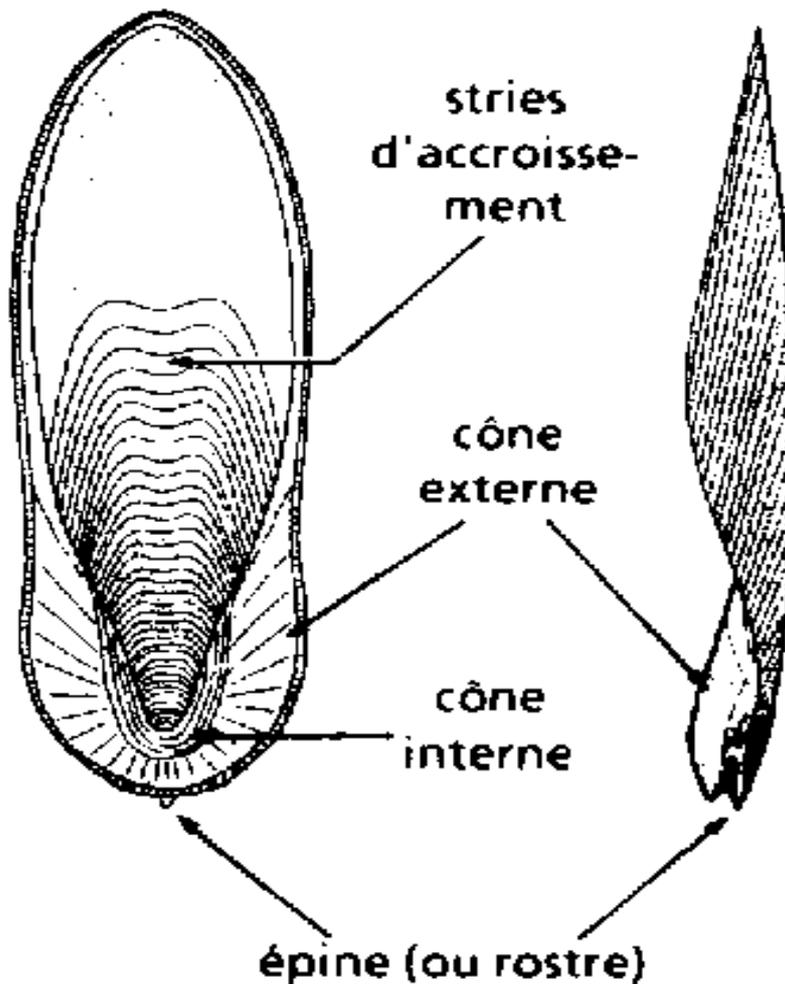


Figure I.6 : Vues ventrale et latérale d'un sépion de seiche<sup>15</sup>

### I.3 Locomotion et moyens de défense

La seiche se déplace de différentes façons. Elle peut faire des déplacements lents et courts, ou à la manière d'un hélicoptère, s'orienter dans les trois (03) dimensions de l'espace dans une sorte de « vol » géostationnaire grâce à ses deux nageoires latérales qui ondulent le long du corps. Elle peut se projeter vers l'arrière en aspirant l'eau de mer et en l'expulsant par une cavité mobile et orientable placée sous la tête. Cette cavité est appelée siphon. Elle peut également utiliser ses tentacules pour se déplacer en s'appuyant sur le sable ou sur les obstacles rencontrés. Le plus souvent, elle combine les différentes techniques. *Sepia officinalis* peut se déplacer très vite pour échapper à un danger en expulsant de l'eau par un siphon situé près de sa tête et masquer sa fuite en émettant un nuage d'encre qui la dissimule et la déroutent de son poursuivant. Cette encre était autrefois utilisée pour écrire<sup>16</sup>.

#### **I.4 Alimentation**

La seiche est un prédateur qui se nourrit de proies vivantes : crustacés, poissons et céphalopodes dans l'ordre décroissant d'importance de la ration alimentaire. Ces animaux benthiques partagent le même habitat que la seiche. Mais le cannibalisme est aussi répandu en cas de "disette".

En tant que prédateur, elle chasse à l'affût enfouie dans le sable. Le stimulus de l'attaque est visuel mais un système équivalent à la ligne latérale a été mis en évidence il y a une dizaine d'années<sup>17</sup>. Pour attaquer, la seiche déploie très rapidement ses tentacules, capture sa proie et la ramène vers sa bouche. Les crabes sont, quant à eux, attaqués par derrière et enveloppés par l'ensemble des bras (mode "coiffage").

Une fois capturée, la proie est maintenue via les ventouses des tentacules jusqu'à ce que le venin injecté par les mâchoires fasse effet. La salive contient en effet des céphalotoxines qui facilitent l'immobilisation de la proie. Cette dernière est ensuite déchiquetée par deux puissantes mâchoires en bec de perroquet avalée.

Mais qu'elles soient au stade juvénile ou adulte, les seiches constituent elles mêmes des proies pour les requins, certains poissons démersaux, les sparidés ...

Les quantités ingérées pourraient représenter quotidiennement jusqu'à 10 ou 30 % du poids des juvéniles, ce qui ne paraît pas improbable au vu des forts taux de croissance<sup>18</sup>.

#### **I.5 Habitat et distribution géographique et Ecologie**

La seiche commune est une espèce benthique néritique qui préfère les fonds sableux et vaseux. On la rencontre dans les estuaires, les côtes ouvertes, les rias. Sa zone de préférence biologique est assez étendue : de la frange sublittorale aux zones infra et circalittorales. La distribution horizontale de la seiche est étendue au niveau des latitudes, mais restreinte au niveau de la longitude. L'aire de répartition de la seiche couvre une mince frange de la bordure orientale de l'Atlantique, mais s'étend des mers Baltique et du Nord jusqu'en Afrique du sud. La Méditerranée offre également de bonnes conditions pour le développement de l'espèce<sup>19</sup>. Cet animal supporte une large gamme de température comprise entre 10 et 25 ° C comme l'indique sa large répartition en latitude. Enfin, la seiche supporte des salinités comprises entre 18 et 40 psu.

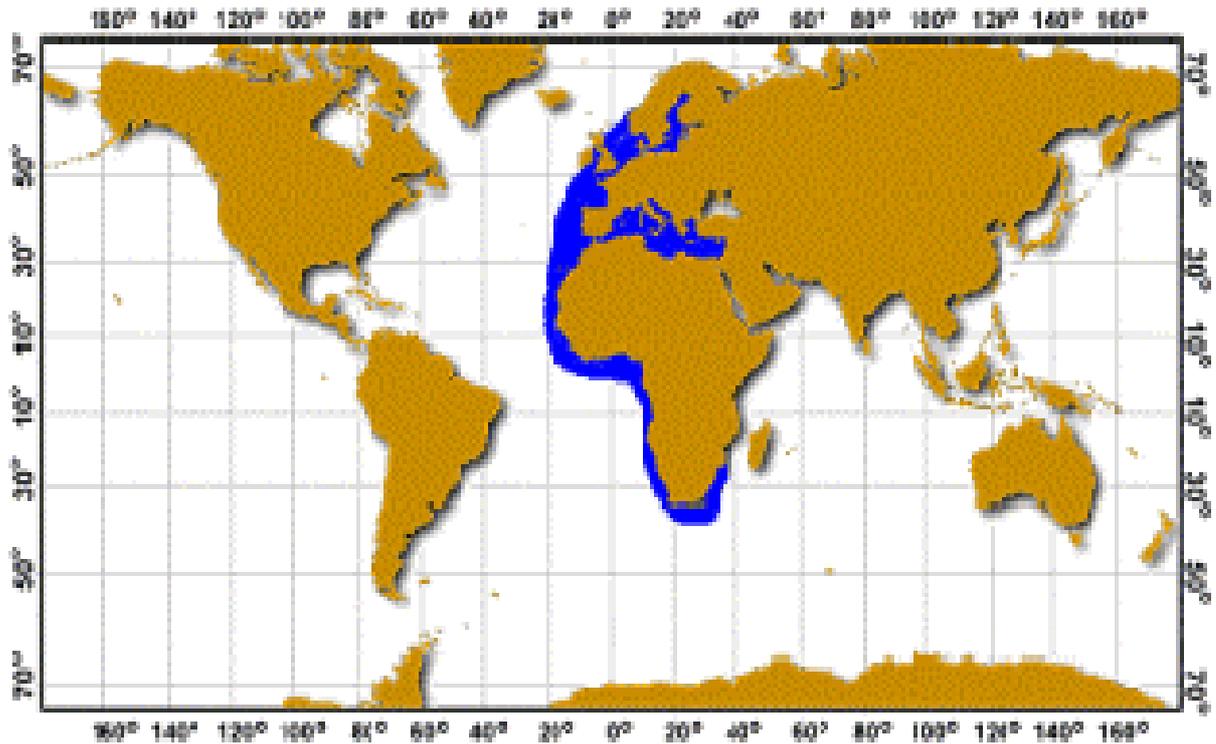


Figure I.7 : Distribution géographique de *Sepia officinalis*<sup>20</sup>

La distribution verticale est nettement plus limitée. Sa morphologie ne lui permet pas de descendre au-dessous de 200 m, ce qui explique sa localisation le long de la frange néritique des océans, sur les larges plateaux vaseux continentaux. L'abondance est plus forte dans la zone des 100 m ; les plus grands individus pouvant descendre plus profondément. En dehors des périodes de reproduction, la seiche reste plus ou moins enfouie toute la journée et s'active dès la tombée de la nuit jusqu'au petit jour à la recherche de nourriture. Elle présente un comportement solitaire.

## I.6 Migration

Les migrations saisonnières sont observables pour l'ensemble des seiches pêchées. Ces migrations sont principalement des migrations verticales dans la colonne d'eau. Dans l'ouest de la Méditerranée, au début du printemps, de grands individus quittent les profondeurs où ils

ont séjourné durant tout l'hiver, pour remonter dans des eaux moins profondes. D'une manière générale, les mâles précèdent les femelles d'environ une semaine. Ce groupe est rejoint par plusieurs vagues de petites seiches durant tout l'été. A la fin de la belle saison, en automne, les seiches redescendent dans des eaux plus profondes<sup>21</sup>. La température est le principal facteur qui régit les migrations des seiches. Dans nos régions, elles se rassemblent dès le printemps dans les eaux littorales pour se reproduire ; en hiver, elles gagnent les eaux plus profondes entre 50 et 150 m.

Des migrations "horizontales" ont été observées. Sur les côtes du Sénégal, un schéma de migration "inshore-offshore" a été étudié par Bakhaykho et Drammeh<sup>22</sup>. En Manche, où les eaux sont peu profondes, et les seiches à la limite septentrionale de leur répartition, il existe de véritables migrations qui les conduisent en hiver dans des eaux proches de l'Atlantique<sup>23</sup>.

### **I.7 Reproduction**

Il existe un dimorphisme sexuel chez la seiche commune, la femelle étant plus longue que le mâle. La maturité sexuelle est acquise à un an environ (légèrement plus précocement chez le mâle)<sup>24</sup>. L'accouplement se fait "tête à tête et ventouses entremêlées". Le mâle change de couleur, son ventre devient vert lumineux et ses tentacules sexuels (les plus extérieures et les plus longues) deviennent zébrées<sup>25</sup>. Il immobilise la femelle avec ses tentacules et y introduit l'un de ses tentacules dit hectocotyle dans la cavité palléale de la femelle au niveau du manteau. Le tentacule hectocotyle y introduit les spermatophores.

Après la fécondation, la ponte a lieu entre les mois de juin et juillet. Les œufs sont pondus sous forme de grappe de raisins noirs comme le montre les figures ci-dessous. Ils sont d'ailleurs communément appelés « raisins de mer ». Ils sont accrochés à un rocher ou une algue, voir des supports issus des activités humaines.



**Figure I.8: Ponte de seiche****Figure I.9: OEufs de seiche sous forme de grappe de raisin<sup>26</sup>**

A la naissance, les petites seiches ou seichons ne font que 1 à 2cm. Il n'y a pas de stade larvaire comme chez le poulpe (*Octopus vulgaris*), les seichons sont des modèles réduits de l'adulte au sortir de l'œuf. La femelle ne s'occupe pas du tout des petits à l'inverse des baleines par exemple.

L'une des particularités de la seiche commune est que les mâles meurent après la reproduction (10 jours après) et la femelle 10 jours après avoir pondu ses œufs. C'est pourquoi au printemps, on retrouve beaucoup d'os de seiche sur les côtes<sup>27</sup>.

### Conclusion

La seiche est un très bon candidat pour son utilisation dans l'industrie de la production de chitosane de par l'extraordinaire quantité de chitine composant le sépion et d'autre part pour sa grande disponibilité dans le monde, et surtout pour les capacités de l'exploitation de sa production dans des enclos (maîtrise de la reproduction).

**Chapitre II :**  
**CHITINE CHITOSANE**

## Introduction

Dans ce chapitre nous allons synthétiser les données bibliographiques concernant l'extraction de la chitine et la préparation du chitosane en analysant les principaux travaux de recherches de base effectuée dans cet axe de recherche.

### II.1 Historique

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

Aujourd'hui, la chitine est obtenue principalement des sous-produits de pêche des crustacés qui en contiennent de 20-50% sur extrait sec<sup>28</sup>

En 1859, le professeur C. Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin et a observé les différentes solubilités de la chitine. La substance, résultant du traitement alcalin, a pu être dissoute dans les acides. Cependant, seulement en 1894 cette substance a été nommée chitosane par Hoppe-Seyler<sup>29</sup>.

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

Aujourd'hui, nous savons que la chitine et le chitosane se trouvent abondamment dans la nature et sont des ressources renouvelables, non toxiques et surtout biodégradables<sup>30</sup>. La production annuelle de chitine dans la nature est estimée à 109-1010 tonnes et actuellement elle n'est pas très exploitée et commercialisée par rapport à la cellulose<sup>31</sup>.

### II.2 Chitine

#### II.2.1 Structure chimique de la chitine

La chitine est un polysaccharide linéaire formé d'unités de N-acétyl-D-glucosamine reliés entre elles par une liaison du type  $\beta$ -(1-4). D'une manière intéressante, la formule chimique de la cellulose est très proche de celle de la chitine, le groupe C(2) hydroxyle a été remplacé par les groupements d'acétamide. En fait, Roberts associe cette similarité entre la molécule de la chitine et celle de la cellulose à une fonction similaire de structure<sup>32</sup> (figure II.1).

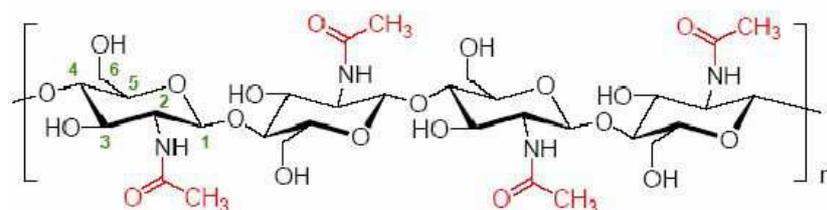


Figure II.1 : Structure chimique de la chitine

### II.2.2 Source de la chitine

La chitine est le deuxième composant très abondant dans la nature après la cellulose, elle n'existe que sous la forme complexe avec des protéines et des minéraux. Ce biopolymère est présent principalement dans l'exosquelette des arthropodes (crustacés), l'endosquelette des céphalopodes (seiche) et les cuticules des insectes<sup>28</sup>.

La chitine se trouve dans la paroi de la plupart des champignons et de certaines algues chlorophycées, levures et bactéries<sup>33</sup>. En plus de son rôle dans le maintien de la rigidité de la cellule, elle contribue au contrôle de la pression osmotique.

Bien que les sources potentielles de chitine soient très nombreuses (tableau II.1), elle est essentiellement produite aujourd'hui à partir des carapaces de crevettes. Pendant longtemps, ces déchets n'étaient pas récupérés et étaient simplement rejetés à la mer après décorticage.

La production de chitine permet de valoriser les déchets de l'industrie agroalimentaire en évitant qu'ils soient rejetés à la mer, ce qui engendre des problèmes de pollution car les carcasses des arthropodes (crustacés, céphalopodes...) sont très résistantes à la biodégradation<sup>34, 35</sup>.

Source de la chitine	Teneur en chitine %
Bernacle ( <i>Lepas anatifera</i> )	7
Crabe marbré ( <i>Grapsus marmoratus</i> )	10
Crabe rouge ( <i>Portunus puber</i> )	10
Crabe araignée ( <i>Maia squinado</i> )	16
Homard ( <i>Homarus vulgaris</i> )	17
Homard sauterelle ( <i>Scyllarus arctus</i> )	25
Langouste ( <i>Palinurus vulgaris</i> )	32
Ecrevisse ( <i>Astacus fluviatilis</i> )	36
Crevette ( <i>Palaemon fabricius</i> )	22
Seiche ( <i>Sepia officinalis</i> )	20
Calamr ( <i>Ioligo vulgaris</i> )	40

<sup>1-</sup> Tableau II.1 : Sources potentielles de la chitine<sup>36</sup>

### II.2.3 Préparation de la chitine<sup>37</sup>

- 1- De nombreuses méthodes ont été développées afin d'extraire la chitine à partir des endosquelettes. De manière générale, elles consistent à éliminer les éléments minéraux (démminéralisation), les protéines (déprotéinisation) et la couleur (blanchiment)<sup>37</sup>

#### II.2.3 1 Démminéralisation :

La démminéralisation se fait par la solubilisation des sels minéraux qui coexistent avec la chitine et les protéines dans un milieu acide (acide fort HCl)<sup>37</sup>

Exemple d'une réaction de solubilisation d'un sel (carbonates de calcium) en milieu acide :



#### II.2.3 2 Déprotéinisation :

A l'état naturel, la chitine se présente en association avec les protéines (Chitinoprotéine). Les protéines sont éliminées par un chauffage et un traitement basique en utilisant, en général, des solutions à base de NaOH, KOH.

La solution d'hydroxyde de sodium est la plus souvent utilisée pour dissoudre les protéines.

#### II.2.3 3 Blanchiment<sup>37</sup> :

Pour les applications industrielles, la chitine obtenue à partir des ressources crustacées doit être décolorée après les traitements acides et alcalin<sup>38</sup>.

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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

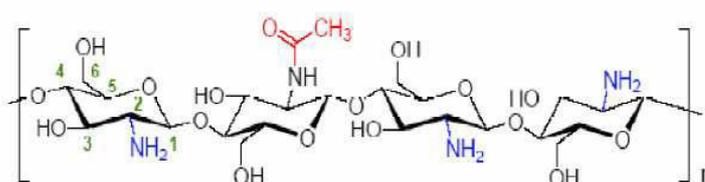
Durant le processus de blanchiment (s'il y a lieu de blanchir la matrice étudiée), le réactif utilisé (comme l'acétone, l'hypochlorite de sodium ...) ne doit pas avoir un effet sur les propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane<sup>69</sup>.

## II.3 Le chitosane

### II.3.1 Définition :

Le chitosane est un polysaccharide de structure linéaire. C'est un biopolymère cationique de glucosamine partiellement acétylé<sup>39</sup>. Le terme chitosane, loin de répondre à une seule et unique structure chimique bien définie, s'adresse à toute une famille de copolymères linéaires à arrangement aléatoire d'unités N-acétyl-D-glucosamine et de D-glucosamine en proportions variables<sup>40</sup>, et liées entre elles par des liaisons  $\beta$ -(1-4) (figure II.2) qui confèrent au chitosane de bonnes caractéristiques filmogènes<sup>41</sup>. Le terme chitosane est habituellement utilisé quand les polymères sont solubles dans une solution d'acide dilué<sup>42</sup>.

Ce biopolymère, naturel et non toxique, est actuellement largement produit industriellement à partir des déchets des carapaces de crabes et des crevettes<sup>43</sup>.



**Figure II.2 : Structure chimique du chitosane<sup>44</sup>**

Généralement, le chitosane a trois types de groupes fonctionnels réactifs : les groupes amines sur le carbone C(2), les groupes hydroxyles primaires et secondaires sur le carbone C(3) et le carbone C(6). La nature chimique du chitosane fournit beaucoup de possibilités alternatives pour des modifications covalentes et ioniques qui permettent l'ajustement étendu des propriétés mécaniques et biologiques. Contrairement à la chitine, le chitosane est peu répandu dans la nature. Il se trouve dans les parois d'une classe particulière de champignons, les zygomycètes et chez quelques insectes. Le chitosane commercialisé provient essentiellement de la désacétylation alcaline de la chitine.

### II.3.2 Production de chitosane par désacétylation de la chitine

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 alcaline. La désacétylation est généralement effectuée par le traitement avec l'hydroxyde de sodium ou potassium concentré (figure II.3). Il y a plusieurs facteurs essentiels qui affectent le rendement de désacétylation comme la température, la durée de la réaction, la concentration d'alcalin, les traitements préalables pour l'obtention de la chitine, la quantité de chitine par rapport à la solution alcaline, densité de la chitine. Compte tenu de ces paramètres, l'objectif idéal de désacétylation est de préparer un chitosane qui est non dégradé et parfaitement soluble dans l'acide dilué (acides acétique, lactique, citrique).

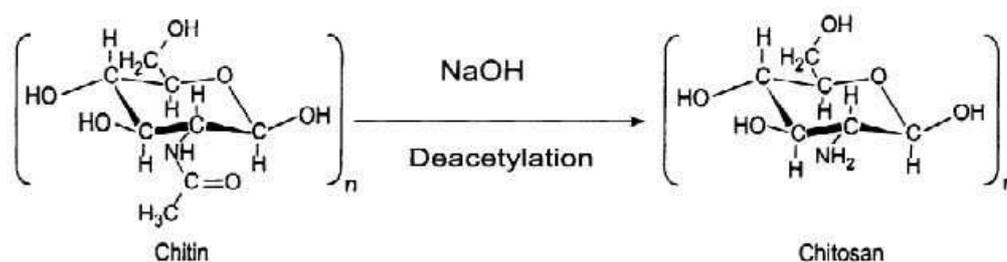


Figure II.3 : Conversion de la chitine en chitosane par la désacétylation

## II.4 Propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane

### II.4.1 Le Degré d'Acétylation (DA) ou le Degré de Désacétylation DA

En dépit de leur désignation chimique spécifique, les noms chitine et chitosane correspondent actuellement à la même famille de polymères. Ils varient seulement sur le nombre de groupement acétyle qui est désigné par le degré d'acétylation.

Le degré d'acétylation présente le taux de groupe acétylé par rapport au groupe non acétylé (figure 4)<sup>45</sup>.

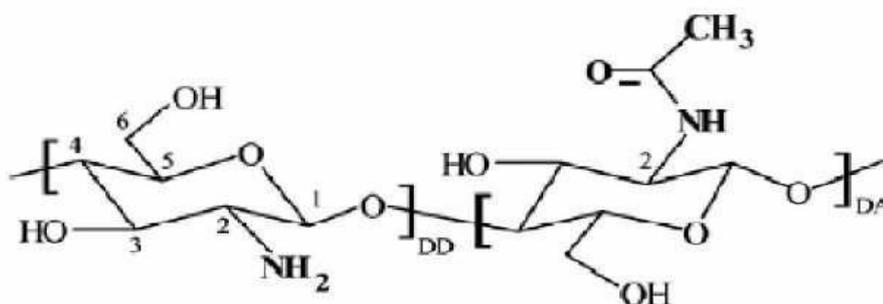


Figure II.4 : Les unités de répétitions structurales de la chitine et du chitosane.

Le degré de désacétylation (DD) est l'une des propriétés les plus importantes du chitosane. Il influe, non seulement sur les caractéristiques chimiques et physiques, mais aussi sur la biodégradation et l'activité immunologique du chitosane<sup>46</sup>.

De nombreuses méthodes sont proposées afin de déterminer le DA sur des échantillons solides : la spectroscopie IR<sup>47</sup>, l'analyse élémentaire<sup>48</sup>, la RMN solide<sup>49</sup> ou sur des échantillons en solution : dosage UV<sup>50</sup>, titrage colloïdal<sup>51</sup>, RMN liquide<sup>52</sup> et titration potentiométrique<sup>53</sup>.

Cependant, la méthode la plus simple est celle de la spectroscopie Infra Rouge proposée par<sup>54</sup>.

Pour différencier la chitine du chitosane, il faut définir le degré d'acétylation (DA) c'est-à-dire le rapport du nombre de motifs comportant un groupement acétyle sur le nombre de motifs dans la molécule. On peut parler aussi de degré de désacétylation (DDA) tel que :  $DDA = 100 - DA$  en %

La chitine correspond à un polymère dont le DDA est inférieur à 60%, sinon il s'agit de chitosane. Aujourd'hui, la production industrielle du chitosane est effectuée par N-désacétylation de la chitine obtenue par déminéralisation et déprotéinisation des carapaces de crustacés, surtout des crabes et des crevettes, ce qui permet de valoriser les déchets de la pêche.

Parmi les diverses méthodes de désacétylation utilisées, la plus courante met en jeu l'hydroxyde de sodium. Le degré de désacétylation dépend de la concentration de l'alcali, de la température et du temps de réaction. La dégradation des chaînes du polymère est observée quand la concentration en NaOH augmente. Aux basses concentrations en NaOH, la désacétylation procède lentement. Le degré de désacétylation peut être augmentée avec le temps de réaction mais l'augmentation des temps de réaction entraîne une croissance des rendements de désacétylation, mais également l'hydrolyse de la chaîne polysaccharide. La désacétylation en milieu basique permet d'atteindre des degrés d'acétylation voisins de 75-85%. De nombreuses méthodes sont proposées dans la littérature pour obtenir des chitosanes avec des degrés de désacétylation élevés (90-96%). La présence des motifs N-acétylglucosamine dans le chitosane entraîne un grand effet sur de nombreuses propriétés du polymère comme la solubilité, le gonflement dans l'eau et la biodégradation du chitosane. Déterminer le degré de désacétylation est par conséquent essentiel<sup>69</sup>.

Le degré d'acétylation (DA) est déterminé en utilisant la formule :

$$DA = (1 - 162 \times Q) / (1 + 43 \times Q)$$

$$Q = (V_{NaOH} \times 0,1) / (1000 \times M_{cs})$$

**Q** : nombre de moles de la fraction aminée du chitosane pour un échantillon de 1g.

**M<sub>cs</sub>** : masse sèche de chitosane.

**V<sub>NaOH</sub> = V<sub>2</sub> - V<sub>1</sub>** : volume versé en ml de NaOH 0,1M entre pH 4,5 et pH 8,5.

**Soient G** : partie Glucosamine et **a** : partie acétylée.

**Ga1** : masse en g des unités de glucosamine acétylée réellement présentes dans l'échantillon.

**Ga2** : masse en g des unités de glucosamine acétylée qu'il y aurait si tous les groupements étaient acétylés.

**Ga1** = 1g - la masse de G = 1g - (nombre de moles de groupements G) X (masse moléculaire de G).

**Ga1** = 1 - Q X 162.

**Ga2** = 1g + la masse des a = 1g + (nombre de mole de groupements G) X (masse moléculaire de a).

**Ga2** = 1 + Q X 43.

#### II.4.2 La masse molaire

La chitine est soluble dans très peu de solvants. Sa masse molaire initiale est de l'ordre de 100000 à 800000 g/mol et elle est généralement fortement acétylée. Les chitosanes obtenus industriellement ont une masse molaire de l'ordre de 200000 g/mol, Pour le chitosane, la masse molaire et la répartition des motifs N-acétylés le long de la chaîne sont dépendantes de la méthode de désacétylation utilisée. De plus, un enchaînement successif de plusieurs motifs N-acétylés confère au polymère un caractère plus hydrophobe, et donc des propriétés auto associatives (propriétés épaississantes et gélifiantes) et modifie sa solubilité.

#### II.4.3 La solubilité

La chitine n'est soluble que dans des solvants peu communs, ce qui limite son utilisation et sa valorisation. En effet, elle n'est soluble que dans le 2-hexafluoropropanol, et dans des mélanges tels que le diméthylacétamide/chlorure de lithium ou l'acide trichloroacétique / dichloroéthane<sup>55</sup>.

Contrairement à la chitine qui est insoluble dans les solvants aqueux, le chitosane est soluble dans les acides faiblement dilués (comme l'acide acétique, lactique, citrique,...).

En raison de sa solubilisation en solution acide, le chitosane se comporte comme un polyélectrolyte cationique de forte densité de charge. Ses propriétés dépendent du pH du milieu. Le chitosane est solubilisé et il devient cationique quand le pH est inférieur au pKa intrinsèque de la fonction amine du chitosane soit 6,3<sup>56</sup>. A un pH supérieur (>6,5), les groupements ne sont plus ionisés et le chitosane se précipite. Autour de pH 6, le nombre de fonctions amine libres devient suffisamment élevé pour induire une association des chaînes et la précipitation du polymère.

#### II.4.4 La viscosité

La viscosité du chitosane dépend du degré d'acétylation de ce polymère. Plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amines libres, plus le chitosane est soluble et par voie de conséquence sa viscosité est plus importante<sup>57</sup>. La viscosité dépend également : de la concentration du polymère (augmente avec la concentration), de la température (elle chute lorsque la température augmente)<sup>58</sup>, du poids moléculaire (la viscosité intrinsèque augmente en fonction de l'augmentation du poids moléculaire)<sup>59</sup> et enfin du pH (plus il est bas plus la viscosité est élevée).

Pour déterminer la viscosité, il existe différentes méthodes. La plus employée est « la viscosimétrie ». Elle nécessite la connaissance des paramètres K et a de la relation de Mark- Houwink<sup>60</sup>.

$$[\eta] = K.M^a$$

$[\eta]$  : la viscosité intrinsèque.

M : le poids moléculaire moyen du polymère.

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

Unité de la viscosité est le (pa.s)

#### II.4.5 La structure cristalline de la chitine

A l'état naturel, la chitine présente une structure fibreuse rigide. Cette propriété induit une insolubilité dans la plupart des solvants. Ce polymère existe sous trois formes polymorphiques selon la source : la chitine  $\alpha$ , la chitine  $\beta$  et la chitine  $\delta$ , qui diffèrent quant à l'arrangement des chaînes dans les régions cristallines, et qui impliquent différents réseaux de liaisons d'hydrogène<sup>61</sup>.

Différents arrangements des chaînes de la chitine sont possibles. Ces chaînes, sous forme d'hélice, sont toutes dirigées suivant le même axe et donnent lieu à trois allomorphes distincts :

La chitine  $\alpha$  : Les chaînes sont disposées de façon antiparallèles, ce qui donne naissance à de nombreux ponts hydrogène, ce qui explique la rigidité et la faible réactivité de la chitine  $\alpha$ . L'analyse par spectroscopie de diffraction des rayons X de la chitine  $\alpha$  met en évidence une structure cristalline de type orthorhombique.

La chitine  $\beta$  : Les chaînes sont parallèles entre elles. Les ponts d'hydrogène sont inexistantes, ce qui confère à la chitine  $\beta$  des propriétés de solubilité et de caractère hydrophile avec l'eau. La chitine  $\beta$  est cristallisée dans une maille monoclinique.

La chitine  $\delta$  : Une structure parallèle et antiparallèle, qui est une combinaison de chitine  $\alpha$  et  $\beta$ .

#### II.4.6 La structure cristalline du chitosane

Le chitosane se cristallise dans le système orthorhombique. Samuels propose pour le chitosane deux types de cristallinité différents. Le type I du chitosane correspondant à un faible degré de désacétylation (60 %) (Sels de chitosane) est plus désordonné que le type II. Celui-ci a un fort degré de désacétylation (90 %) (Forme amine libre).

#### II.5 Les applications de la chitine et du chitosane

De par leurs bonnes caractéristiques et propriétés biologiques uniques telles que : la biocompatibilité,

la biodégradabilité, la non-toxicité, l'inertie physiologique et l'affinité remarquable aux protéines<sup>62</sup>, la chitine et le chitosane ont des applications étendues et très diverses comme dans les industries d'alimentation, de textile et de produits de beauté, en plus des applications environnementales et biomédicales<sup>63</sup>. Le suivant présente quelques applications de la chitine et du chitosane<sup>64</sup>.

<b>Domaines</b>	<b>Applications</b>
<b>Agriculture</b>	Protection des plantes ; augmentation des rendements de récolte (réduction de la croissance des mycètes phytopathologique); enduit de graine et d'engrais; traitement du sol.
<b>La technologie biomédicale</b>	Activités biologiques (antifongique, antimicrobien, anti-infectieux) ; agent anti-tumoral; effet hémostatique ; augmentation de la coagulation du sang ; favorisation de la croissance du tissu ; stimulation de la prolifération des cellules ; peau artificielle ; fils de suture/bandage, ophtalmologie ; lentilles de contact.
<b>La biotechnologie</b>	Immobilisation des cellules et des enzymes ; matériaux stimulants de cellules ; matrice pour l'affinité ou les membranes.
<b>La chimie industrielle</b>	Purification d'eau (chélation des métaux) ; technologie de l'eau (floculation, absorption) ; traitement des boues ; membranes d'osmose inverse, membranes de filtration ; séparation des gaz ; production de films d'emballage biodégradables ; la catalyse.
<b>Cosmétique et toilette</b>	Les laques pour les cheveux ; lotion ; crème pour le corps et les mains;shampooing ; crèmes hydratantes.
<b>L'industrie alimentaire</b>	Régime alimentaire et fibre diététique ; activité hypocholestérolémie (liaison cholestérol, acides gras et mono glycérides) ; la conservation des nourritures de la détérioration microbienne ; la bioconversion pour la production de produits alimentaires à valeur additionnée; rétablissement des déchets de la transformation des produits alimentaires ; clarification et désacidification des jus de fruit et des boissons ;agent émulsionnant; stabilisant de couleur ; additives alimentaires des animaux.
<b>Pharmaceutique</b>	Commandés de micro capsules (formant des gels et des capsules avec des polymères anioniques) ; transporteur des médicaments à libération contrôlée ; produits dermatologiques (traitement de l'acné).
<b>Autres</b>	Textile (propriétés anti- bactériennes) ; pulpe et papier (résistance au mouillage); dentisterie (implants dentaires) ; photographie (papier).

**Tableau II.2 : Quelques applications de la chitine et du chitosane.**

**Partie pratique :**

**Chapitre III :**  
**MATERIEL ET METHODE**

Introduction :

Dans ce chapitre nous allons mettre au point un plan d'expérience adéquat a l'optimisation de l'extraction de la chitine à partir d'endosquelette de la seiche par la méthode chimique <sup>65,66,67</sup>, puis l'étude complète de la cinétique réactionnelle de la transformation de la chintine en chitosane , et enfin différents grade de chitosane sont préparés .

**Duré de l'étude :**

Les manipulations ont été faite durant un lapse de temps très cours, mais d'une manière très efficace (15/24H de manipulation), durant environs 2 mois (avril et mai 2014).

**Les endroits ou l'étude a été effectuée :**

L'étude a été effectuée dans différents laboratoires par rapport a la disponibilité du matériel et au horaires d'ouverture des laboratoires.

Etape	laboratoire	Matériel utilisé
Broyage	Laboratoire de géo-matériaux (USTHB)	Broyeur.
Déminéralisation, déprotéinisation.	Laboratoire de microbiologie (ENSV). Laboratoire de parasitologie (ENSV).	agitateur magnétique, étuve.....
Détermination du degré de désacytilation (potentiométrie)	Laboratoire de chimie (ENSV)	pH mètre, burette, agitateur magnétique, balance.....
Identification de la chitine	Laboratoire de génie des procédés industriels USTHB	Spectrophotomètre infra rouge a transformée de Fourier(FTIR).
Teste physicochimiques du chitosane	Laboratoire de cristallographie et cristallogenèse (USTHB)	Four a hotte température (600°C),....

**Matériels :**

**Réactifs chimiques:**

- Eau distillé
- NaOH (grade analytique)
- HCl (grade analytique)

- Méthanol (grade analytique)

**Matériels de laboratoire :**

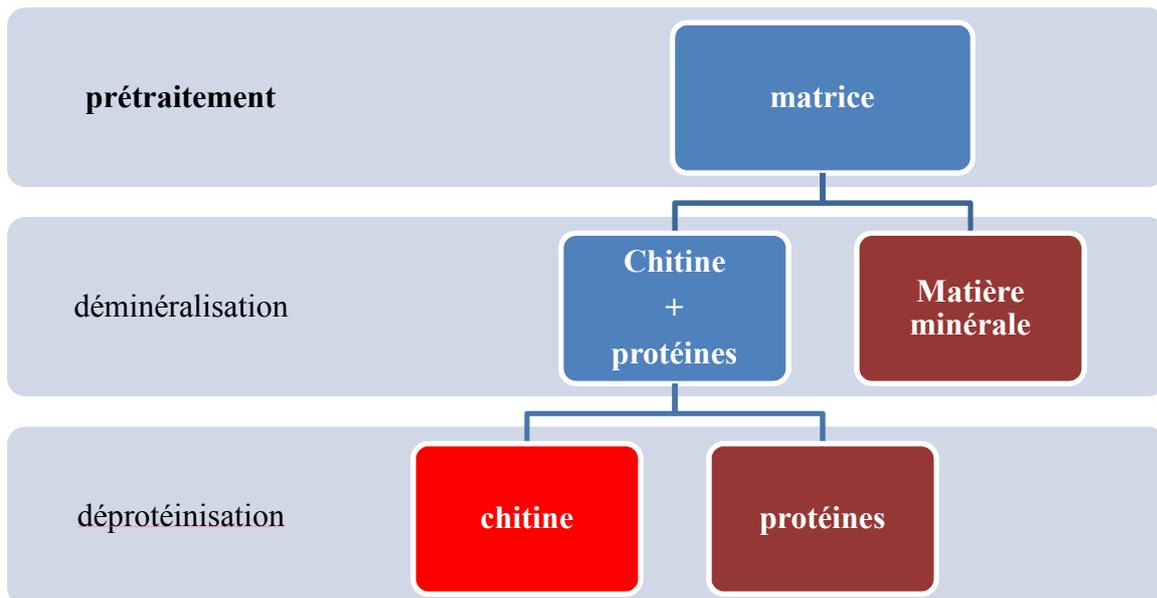
- 1- Broyeur
- 2- Dispositif d'agitation :
  - Plaque agitatrice
  - Barreau *magnétique*
  - Bécher
- 3- Dispositif de filtration :
  - Papier filtre Wattman n°1
  - Entonnoir
  - Erlenmeyer
- 4- Etuve
- 5- Balance

**Méthodes :**

La méthode d'extraction utilisé dans se travail est la méthode chimique, les endosquelettes passent par un prétraitement, une opération de déminéralisation et enfin une déprotéinisation.

Ensuite la préparation du chitosane a été étudiée dans un milieu basique avec chauffage.

Les étapes détalées sont présentées dans le chapitre matériel et méthodes si dessous.



**Résumé du mode opératoire de l'extraction de la chitine.**

### III.1 : Extraction de la chitine et préparation du chitosane :

#### III.1.1. Extraction de la chitine :

##### Obtention de la matière première :

Les endosquelettes ont été récupéré gratuitement de la poissonnerie « fruits de mer chez SIKI frères ‘le petit port El-Djamila’ » installé au port de pêche et de plaisance El-DJAMILA (LAMADRAG) a AIN-LBENIANE, Alger, Algérie.



**Figure III.1 : photographie de la poissonnerie « fruits de mer chez SIKI frères ‘le petit port El-Djamila’ ».**

##### III.1.1. 1. Prétraitement :

Lavage des endosquelettes de la sèche «*sépie officinalis* » a l'eau bouillante (a 100 °C) durant 30 min à 3 reprise. sécher a l'air libre pendant 2 jours, puis broyer à l'aide d'un broyeur modèle IKA au laboratoire de matériaux faculté de géologie-USTHB de manière à obtenir une poudre dont la taille des particules est inférieure à 0.5mm<sup>68</sup>

Séchage durant 2h a l'étuve a 80 °C.

##### III.1.1. 2. Déminéralisation :

- Optimisation de l'opération de déminéralisation à l'aide d'un plan d'expériences :

Le plan utilisé est un plan factoriel complet à deux niveaux avec 3 facteurs :

Facteur 1 : ratio MPPT/HCl : [1 :10,1 :15]

Facteur 2 : concentration de la solution HCl : [1,2] (mol/l)

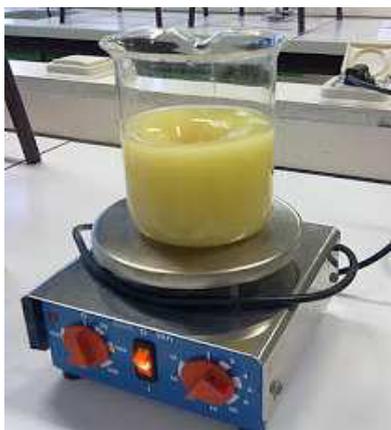
Facteur 3 : temps : [30,60] (min)

Réponse 1 : rendement (%)

Réponse 2 : aspect (conforme, non conforme)

- Mode opératoire :

On rajoute de l'HCl (**1N ou 2N**) a 50g de matière première prétraité (MPPT) a un ratio de (**1/10 ou 1/15**) ; on mélange à température ambiante durant (**30 ou 60 min**).



**Figure III.2** : photographie du Dispositif d'agitation (Plaque agitatrice, Barreau *magnétique*, Bêcher).

Le produit est filtré à l'aide de papier filtre wattman n°1, après 10 lavages a l'eau distillée puis 2 lavages au méthanol le filtrat est étuvé a 80°C durant 2h.



**Figure III.3** : photographie du Dispositif de filtration : (Papier filtre Wattman n°1, Entonnoir, Erlenmeyer).



**Figure III.4** : photographie de l'étuve utilisée.



**Figure III.5** : photographie de la balance utilisée.

Le produit séché est pesé à l'aide d'une balance électronique.

Les données statistiques sont traitées par logiciel informatique «Portable Statgraphics Centurion 15.2.11.0».

### **III.1.1. 3. Déprotéinisation :**

- Optimisation de l'opération de déprotéinisation à l'aide d'un plan d'expériences :

Le plan utilisé est un plan factoriel complet à deux niveaux avec 3 facteurs :

Facteur 1 : ratio ED/NaOH : [1 :15,1 :20]

Facteur 2 : concentration de la solution NaOH : [1,3] (mol/l)

Facteur 3 : temps : [100,500] (min)

Réponse 1 : rendement (%)

Réponse 2 : aspect (conforme, non conforme)

- Mode opératoire :

On rajoute de l'NaOH (**1N ou 3N**) à 50g d'extrait déminéralisé (ED) à un ratio de (**1/15 ou 1/20**) ; on mélange à 80°C durant (**100 ou 500 min**).

Le produit est filtré à l'aide de papier filtre wattman n°1, après 10 lavages à l'eau distillée puis 2 lavages au méthanol le filtrat est étuvé à 80°C durant 2h.

Le produit séché est pesé à l'aide d'une balance électronique.

Les données statistiques sont traitées par logiciel informatique «Portable Statgraphics Centurion 15.2.11.0 ».

Remarque :

1- le plan d'expériences pour l'optimisation de la déminéralisation a abouti à deux expériences optimums très proches d'où l'intérêt de tripler les deux expériences à fin de trancher sur les conditions opératoires optimales.

Puis le facteur le plus influent ([HCl]) a été étudié d'une manière encore plus poussée en allant vers des concentrations qui dépassent les niveaux proposés par le plan d'expériences ([HCl]=0.5 mol/l, puis [HCl]=0.75 mol/l).

2- Le plan d'expériences pour l'optimisation de la déprotéinisation a montré des rendements très intéressants et très rapprochés. D'où la satisfaction par les résultats et la perspective d'étudier l'influence du facteur « température ».

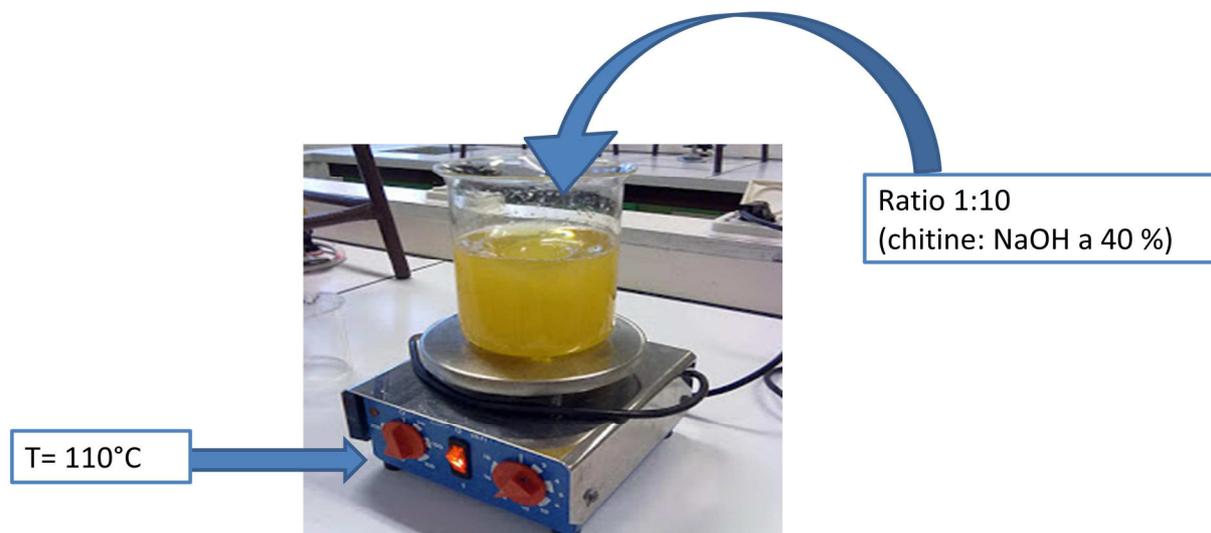
### **III.1.2. Préparation du chitosane :**

#### **III.1.2. 1. Etude cinétique de la réaction de désacylation de la chitine pour l'obtention du chitosane :**

- **Mode opératoire :**

20 g de chitine sont rajoutés à 300 ml d'NaOH (ratio 1/15) sous agitation à une température de 110°C, des prélèvements de 15 ml sont effectués chaque 10 min la première heure puis chaque 30min jusqu'à 180 min.

Les prélèvements sont filtré a l'aide de papier filtre wattman n°1, après 10 lavages a l'eau distillé le produit est séché a l'air libre durant 24h puis étuvé a 80°C durant 2h.



### Temps de réaction ?

**Figure III.6** : photographie du déroulement de la réaction de déacétylation, introduit dans un schéma représentant les conditions opératoires.

### Détermination du degré d'acétylation des différents prélèvements Par titration potentiométrique :

Le degré d'acétylation du chitosane est exprimé en %. Cette formule est le rapport entre la masse d'unités de glucosamine acétylée (Ga1) en g dans l'échantillon sur la masse (Ga2) en g si tous les groupements étaient acétylés avec :

$$Q = (V_{\text{NaOH}} \times 0,1) / (1000 \times M_{\text{cs}})$$

Q : nombre de moles de la fraction aminée du chitosane pour un échantillon de 1g.

Mcs : masse sèche de chitosane.

$V_{\text{NaOH}} = V2 - V1$  : volume versé en ml de NaOH 0,1M entre pH 4,5 et pH 8,5.

Soient G : partie Glucosamine et a : partie acétylée.

Ga1 : masse en g des unités de glucosamine acétylée réellement présentes dans l'échantillon.

Ga2 : masse en g des unités de glucosamine acétylée qu'il y aurait si tous les groupements étaient acétylés.

Ga1 = 1g – la masse de G = 1g – (nombre de moles de groupements G) X (masse moléculaire

de G)

$$Ga1 = 1 - Q \times 162$$

Ga2 = 1g + la masse des a = 1g + (nombre de mole de groupements G) X (masse moléculaire de a)

$$Ga2 = 1 + Q \times 43$$

Degré d'acétylation :

$$DA = (1 - 162 \times Q) / (1 + 43 \times Q)$$



**Figure III.7 : montage de la titration potentiométrique assistée par micro-ordinateur.**

### **III.1.2. 2. Préparation des chitosanes avec différents degrés d'acétylation :**

**Les conditions opératoires :**

- Ratio chitine/NaOH = 1/15
- [NaOH] = 40%
- Température = 110°C

Le facteur temps varie en fonction du degré d'acétylation souhaité : 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%.

### **III.2. Caractérisation physicochimique :**

#### **III.2.1. Identification de la chitine par FTIR spectroscopie :**

La chitine extraite est identifiée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, à l'aide d'un Spectrophotomètre Infra Rouge à Transformée de Fourier 'Tensor 27 FT-IR

spectrophotometer', l'échantillon sous forme de poudre est mis entre les deux diamants et la lecture est directement faite<sup>79,80</sup>.

Les transmittances sont récoltées tout au long de la gamme IR (de 4000 à 400  $\text{Cm}^{-1}$ ) sous forme de bandes sur le spectre infrarouge présenté dans la figure IV.5<sup>81</sup>.



**Figure III.8 : Spectrophotomètre infra rouge à transformée de fourrier 'Tensor 27'**

### **III.2.2. Détermination du DA des chitosanes préparé :**

Le DA est déterminé par potentiométrie en utilisant le même mode opératoire précédemment décrit dans en III.2.1.

### **III.2.3. Détermination des caractères :**

#### **III.2.3. 1. Aspect organoleptique et solubilité :**

- 1- Odeur
- 2- Saveur
- 3- couleur
- 4- Solubilité dans les milieux aqueux
- 5- Solubilité dans les milieux organiques

#### **III.2.3. 2. Détermination de la pureté :**

On met 5g de chitosane dans 100ml d'eau distillée, puis on met sous agitation durant 2 minutes. Le mélange est filtré sur filtre serré.

Après évaporation du filtrat et séchage du filtré a 100-105°C, la teneur en matières soluble est déterminé.

La teneur en matières soluble ne doit pas dépassé 5%.

### **III.2.4. Aisés de matière première selon la pharmacopée européenne, et étude de sa conformité à la formulation pharmaceutique et alimentaire:**

#### **III.2.4. 1. Perte a la dessiccation :**

10g de chitosane pesé dans un creusé en verre sont desséché dans l'étuve a 100-105°C jusqu'à masse constante, la quantité de résidu sec est pesé après refroidissement au dessiccateur.

La perte de poids doit être inférieure à 10%.

#### **III.2.4. 2. Cendres :**

1g de chitosane est mis dans un creusé en porcelaine puis incinéré a 600°C pendant 6 heures dans un four a haute température (Laboratoire de cristallographie et cristallogénèse, faculté de chimie, USTHB). Le creusé est refroidit dans un dessiccateur puis peser.



**Figure III.9 : four a haute température.**

Le taux de cendres totales ne doit pas être supérieur à 3%.

# **Chapitre IV :**

## **Résultats et discussions**

**IV.1 : Extraction de la chitine et préparation du chitosane :****IV.1 .1. Extraction de la chitine :****IV.1 .1. 1. Prétraitement :**

**Figure IV.1: Les endosquelettes de la sèche «*sépia officinalis* » avant prétraitement.**



**Figure IV.2: Les endosquelettes de la sèche «*sépia officinalis* » après prétraitement.**

**IV.1 .1. 2. Déminéralisation :**

- Optimisation de l'opération de déminéralisation a l'aide d'un plan d'expériences :

Le plan utilisé est un plan factoriel complet à deux niveaux avec 3 facteurs :

Facteur 1 : ratio MPPT/HCl : [1/10,1/15]

Facteur 2 : concentration de la solution HCl : [1,2] (mol/l)

Facteur 3 : temps : [30,60] (min)

Réponse 1 : rendement (%)

Réponse 2 : aspect (conforme, non conforme)

**Réponse 1 : rendement (%) :**

- Traitement des données statistiques sont par le logiciel informatique «Portable Statgraphics Centurion 15.2.11.0 » :

N°	expérience	Facteur A	Facteur B	Facteur C
1	DM1	1 :15	2	30
2	DM2	1 :10	2	30
3	DM3	1 :15	1	30
4	<b>DM4</b>	<b>1 :10</b>	<b>1</b>	<b>30</b>
5	DM5	1 :15	2	60
6	DM6	1 :10	2	60
7	DM7	1 :15	1	60
8	DM8	1 :10	1	60

Tableau n°1 : présentation des 8 expériences de déminéralisation

Etape n°1 : détermination de l'expérience désirable, présentant le rendement maximale.

<i>Expériences</i>	<i>rendements</i>	<i>Désirabilité</i>
<b>1 (DM8)</b>	40.48	0.990357
<b>2(DM5)</b>	5.56	0.027439
<b>3(DM2)</b>	10.34	0.135564
<b>4(DM3)</b>	24.68	0.542258
<b>5(DM7)</b>	24.22	0.529212
<b>6(DM1)</b>	12.36	0.192853
<b>7 (DM4)</b>	<b>40.82</b>	<b>1.0</b>
<b>8(DM6)</b>	11.4	0.165627

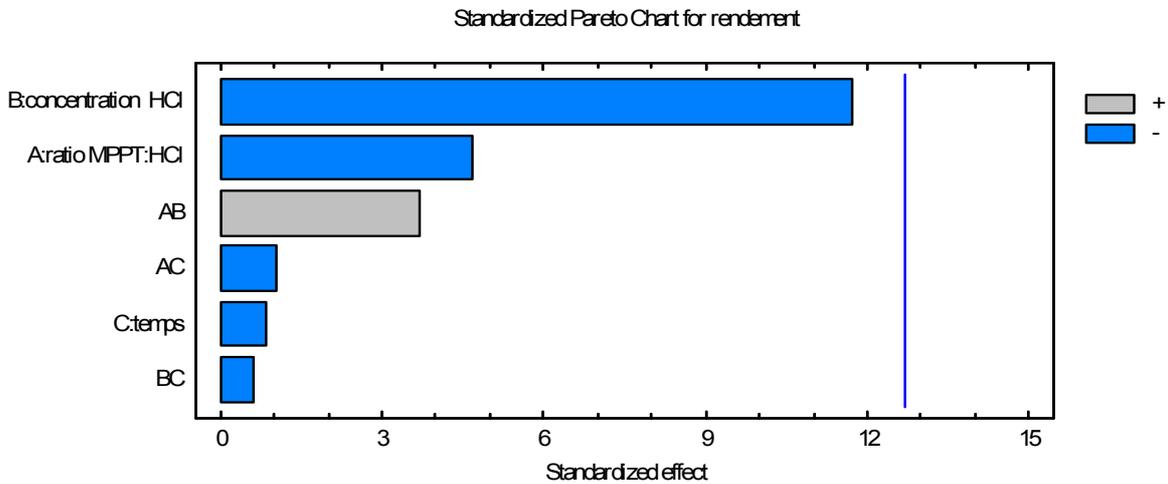
Tableau n°2 : présentation des 8 expériences de déminéralisation et leurs rendements et désirabilité.

Etape n°2 : détermination des coefficients du modèle mathématique correspondant à notre plan factoriel complet à deux niveaux et trois facteurs.

<i>Effets</i>	<i>Estimations</i>
<b>A:ratio MPPT:HCl</b>	<b>-9.055</b>
<b>B:concentration HCl</b>	<b>-22.635</b>
<b>C:temps</b>	<b>-1.635</b>
<b>AB</b>	<b>7.145</b>
<b>AC</b>	<b>-1.995</b>
<b>BC</b>	<b>-1.235</b>

Tableau n°3 : estimation des effets sur le rendement.

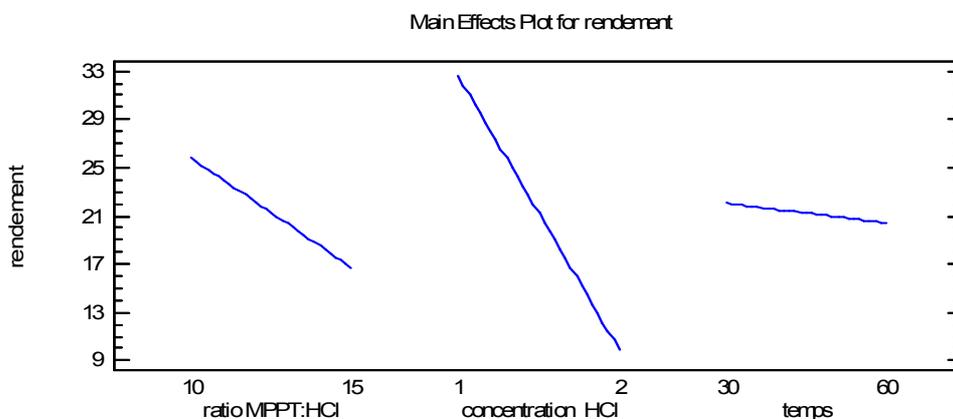
Etape n°3 : détermination de l'effet de chaque coefficient du modèle mathématique correspondant à notre plan factoriel complet a deux niveaux et trois facteurs.



**Figure IV.3** : estimation des effets sur le rendement.

Le facteur correspondant à l'interaction entre le facteur A (ratio MPPT:HCl) et B (concentration HCl) est le plus influent positivement sur le rendement.

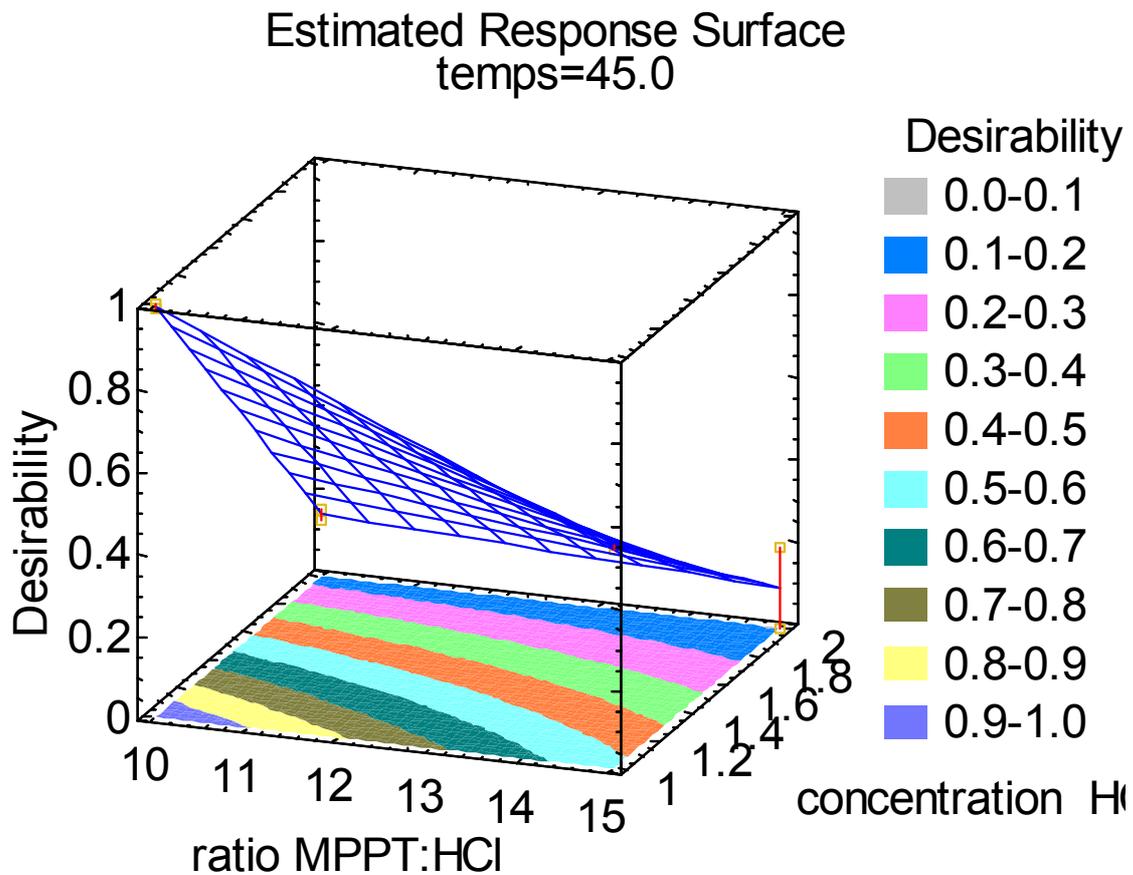
Etape n°4 : détermination de l'effet de chaque paramètre sur le rendement de notre plan factoriel complet à deux niveaux et trois facteurs.



**Figure IV.4** : estimation des effets sur le rendement.

L'effet des facteurs A et B sont plus importants que l'effet du facteur C.

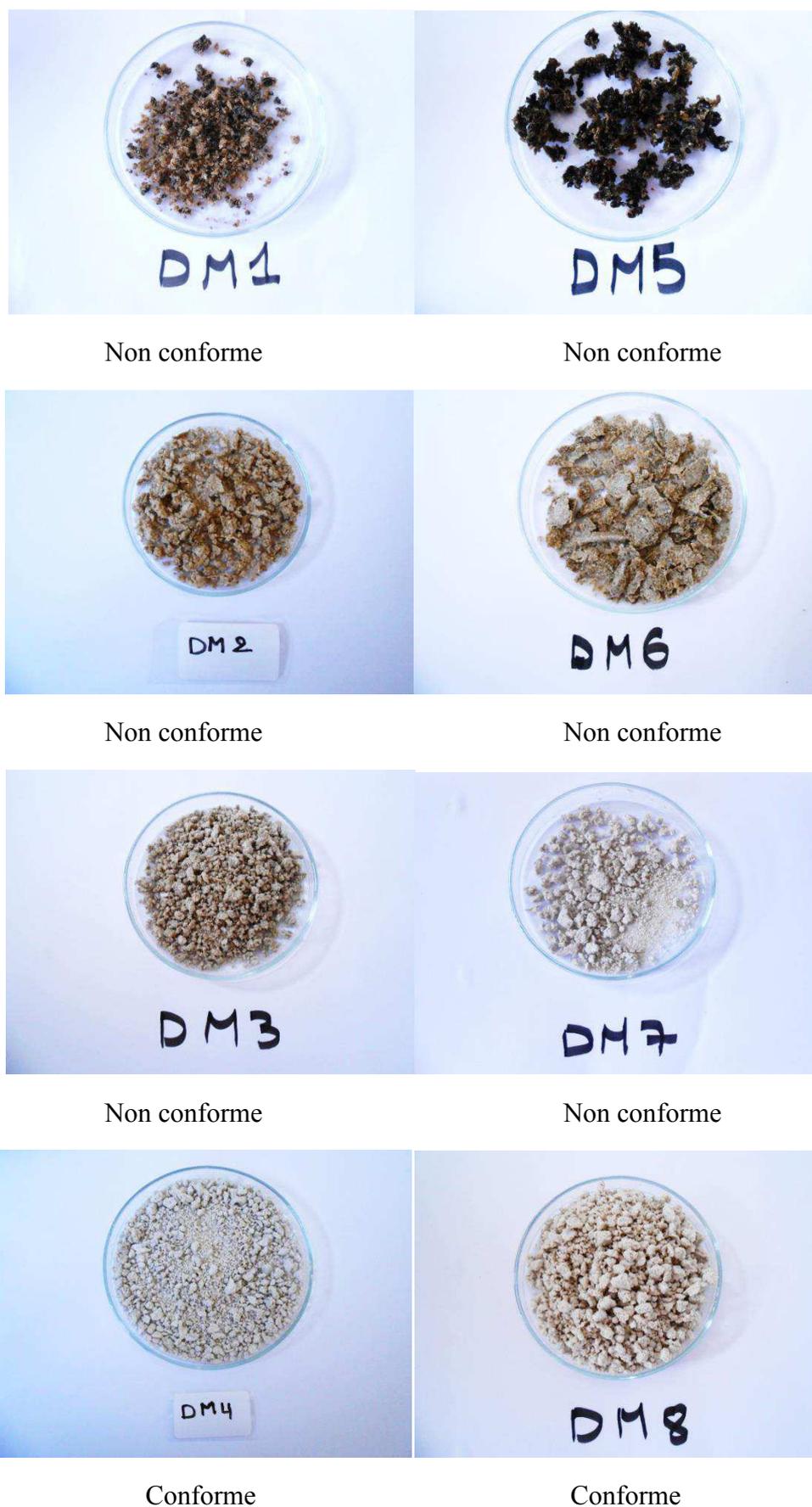
Etape n°5 : détermination de l'effet des deux paramètres influents sur le rendement de notre plan factoriel complet a deux niveaux et trois facteurs en considérant le facteur temps constant (en fonction du temps moyen  $t=45\text{min}$ ).



**Figure IV.5 : présentation des effets A et B en fixant C par les surfaces de réponses et en plages**

Pour un temps d'extraction fixe, le rendement est plus important lorsque la concentration d'HCl diminue et le ratio MPPT : HCl est moins important.

**Réponse 2 : aspect (conforme, non conforme) :**



**Figure IV.6: les 8 différents extraits obtenus après déminéralisation.**

Remarque :

Le plan d'expériences pour l'optimisation de la déminéralisation a abouti à deux expériences optimums très proches d'où l'intérêt de tripler les deux expériences à fin de trancher sur les conditions opératoires optimales.

Essais	Rendement Expérience N°	Rendement Expérience N°
	4	8
N° 1	40.82	40.48
N°2	40.61	40.51
N°3	40.87	40.43
<b>Moyenne :</b>	<b>40.7666667</b>	40.4733333

Donc l'expérience optimum est : l'expérience N°4.

Les conditions opératoires optimales sont :

- Facteur 1 : ratio MPPT/HCl : 1/10
- Facteur 2 : concentration de la solution HCl : 1 mol/l
- Facteur 3 : temps : 30 min

Puis le facteur le plus influent ([HCl]) a été étudié d'une manière encore plus poussée en allant vers des concentrations qui dépassent les niveaux proposés par le plan d'expériences ([HCl]=0.5 mol/l, puis [HCl]=0.75 mol/l).

<b>Facteurs</b> <b>Expériences</b>	<b>Expérience N°4</b>	<b>Expérience 0.75</b>	<b>Expérience 0.5</b>
ratio MPPT/HCl <b>fixe</b>	1/10	1/10	1/10
Temps <b>Fixe</b>	30 min	30 min	30 min
concentration de la solution HCl <b>variable</b>	1 mol/l	0.75 mol/l	0.5 mol/l
<b>Rendement (%)</b>	<b>40.76</b>	<b>39.1</b>	<b>37.8</b>
<b>Aspect de l'extrait</b>	<b>Conforme</b>	<b>Conforme</b>	<b>Conforme</b>
<b>Résultats :</b>	<b>Optimum</b>	-	-

Donc l'optimum reste toujours l'expérience N°4 du plan d'expériences.

### IV.1 .1. 3. Déprotéinisation :

- **Optimisation de l'opération de déprotéinisation à l'aide d'un plan d'expériences :**

Le plan utilisé est un plan factoriel complet à deux niveaux avec 3 facteurs :

Facteur 1 : ratio ED/NaOH : [1/15,1/20]

Facteur 2 : concentration de la solution NaOH : [1,3] (mol/l)

Facteur 3 : temps : [100,500] (min)

Réponse 1 : rendement (%)

- Traitement des données statistiques sont faites par le logiciel informatique «Portable Statgraphics Centurion 15.2.11.0 » :

N°	Expérience	Facteur A	Facteur B	Facteur C
1	DP1	1 :20	3	100
2	DP2	1 :15	3	100
3	DP3	1 :20	1	100
4	DP4	1 :15	1	100
5	<b>DP5</b>	<b>1 :20</b>	<b>3</b>	<b>500</b>
6	DP6	1 :15	3	500
7	DP7	1 :20	1	500
8	DP8	1 :15	1	500

Tableau n°4 : présentation des 8 expériences de déprotéinisation

Etape n°1 : détermination de l'expérience désirable, présentant le rendement maximale.

<b>Expérience</b>	<b>rendement</b>	<b>Désirabilité</b>
<b>1 (DP7)</b>	63.8	0.875
<b>2 (DP4)</b>	60.34	0.0355263
<b>3 (DP2)</b>	60.78	0.0802632
<b>4 (DP3)</b>	60.42	0.0
<b>5 (DP8)</b>	62.7	0.656579
<b>6 (DP1)</b>	60.78	0.151316
<b>7 (DP5)</b>	<b>64.14</b>	<b>1.0</b>
<b>8 (DP6)</b>	64.04	0.938158

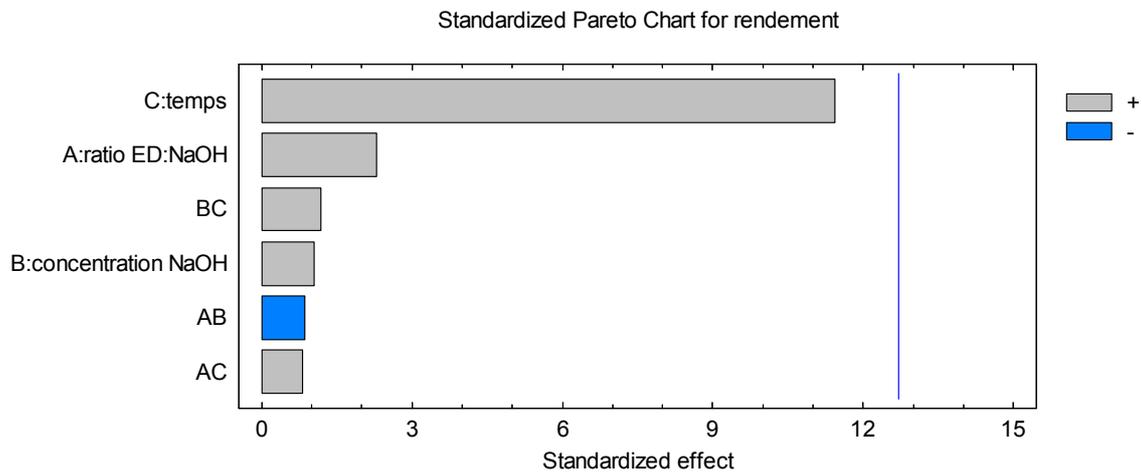
Tableau n°5 : présentation des 8 expériences de déminéralisation et leurs rendements et désirabilité.

Etape n°2 : détermination des coefficients du modèle mathématique correspondant à notre plan factoriel complet à deux niveaux et trois facteurs.

<b>Effect</b>	<b>Estimate</b>
A:ratio ED:NaOH	<b>0.62</b>
B:concentration NaOH	<b>0.28</b>
C:temps	<b>3.09</b>
AB	<b>-0.23</b>
AC	<b>0.22</b>
BC	<b>0.32</b>

Tableau n°6 : estimation des effets sur le rendement.

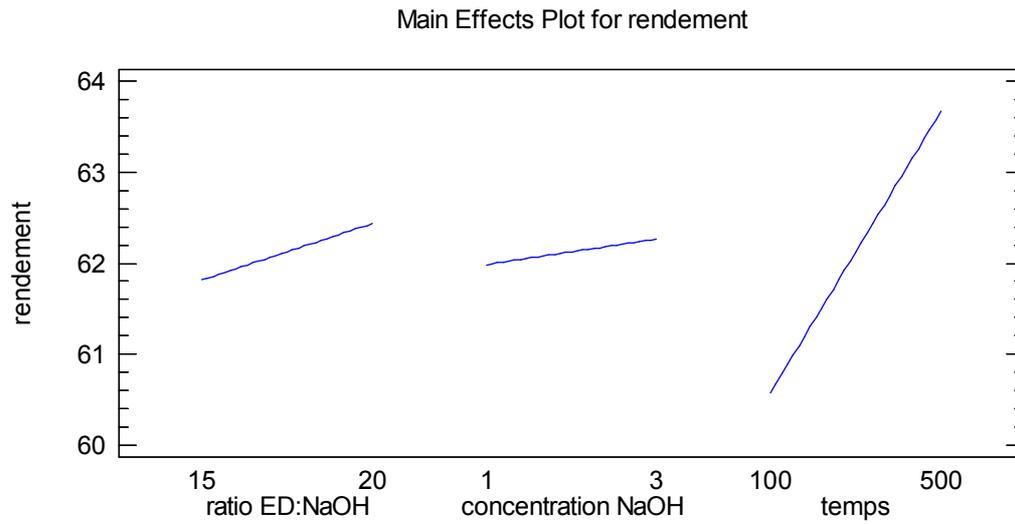
Etape n°3 : détermination de l'effet de chaque coefficient du modèle mathématique correspondant à notre plan factoriel complet à deux niveaux et trois facteurs.



**Figure IV.7** : estimation des effets sur le rendement.

Tous les facteurs influent positivement sur le rendement à l'exception du facteur correspondant à l'interaction entre le facteur A (ratio ED:NaOH) et B (concentration NaOH).

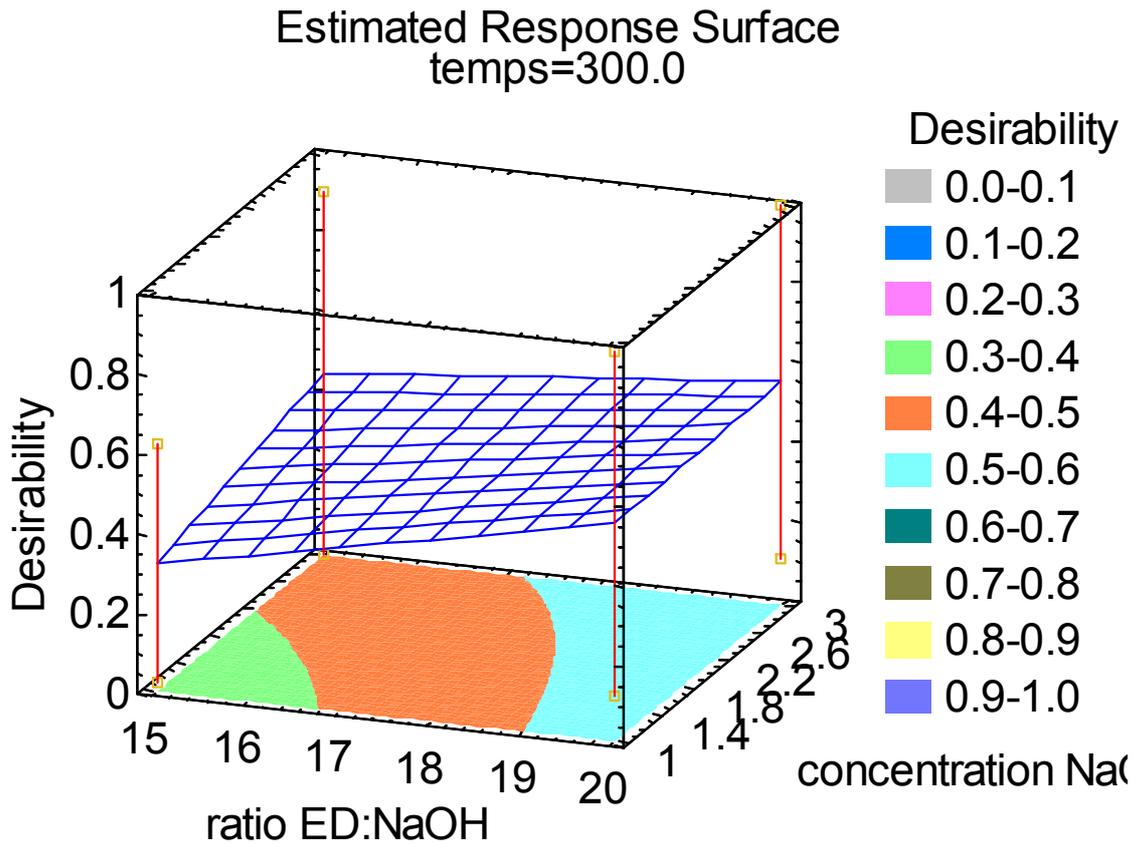
Etape n°4 : détermination de l'effet de chaque paramètre sur le rendement de notre plan factoriel complet à deux niveaux et trois facteurs.



**Figure IV.8** : estimation des effets sur le rendement.

L'effet des facteurs A(ratio ED:NaOH) et B (concentration NaOH) sont moins importants que l'effet du facteur C (temps).

Etape n°5 : détermination de l'effet des deux paramètres influents sur le rendement de notre plan factoriel complet a deux niveaux et trois facteurs en considérant le facteur temps constant (en fonction du temps moyen  $t=45\text{min}$ ).



**Figure IV.9** présentation des effets A et B en fixant C par les surfaces de réponses et en plages

Pour un temps d'extraction fixe, le rendement est moyen et pratiquement stable lors ce que la concentration d'HCl et le ratio MPPT : HCl varient, ce qui confirme que les facteurs A et B n'influent pas significativement sur le rendement et que le temps moyen (300 min) est très loin d'être désirable par rapport au niveau haut du facteur temps qui est de 500 min.

Les conditions opératoires optimales sont :

- Facteur 1 : ratio EDM /NaOH : 1/20
- Facteur 2 : concentration de la solution NaOH : 3 mol/l
- Facteur 3 : temps : 500min

**Conclusion :**

La composition de l'endosquelette de la sèche « *sépiea officinalis* » pêché dans le territoire algériennes de la méditerrané :

- Matières minérale : 59.24 %.
- Matières protéique : 14.62%.
- **chitine : 26.14%.**

**IV.1 .2. Préparation du chitosane :****IV.1 .2.1. Etude cinétique de la réaction de désacytation de la chitine pour l'obtention du chitosane :**

N° de prélèvement	Temps de prélèvement (min)	Volume d'NaOH (ml)	Q	DA	DD
1	10	13.6	0.00136	73.6603431	26.3396569
2	20	22.2	0.00222	58.4558085	41.5441915
3	30	29.3	0.00293	46.6558318	53.3441682
4	40	39.2	0.00392	31.2316013	68.7683987
5	60	43.4	0.00434	25.0223323	74.9776677
6	90	48	0.0048	18.4350133	81.5649867
7	120	53.2	0.00532	11.2438556	88.7561444
8	150	59	0.0059	3.52556433	96.4744357
9	180	59	0.0059	3.52556433	96.4744357

Tableau n°7 : étude cinétique..

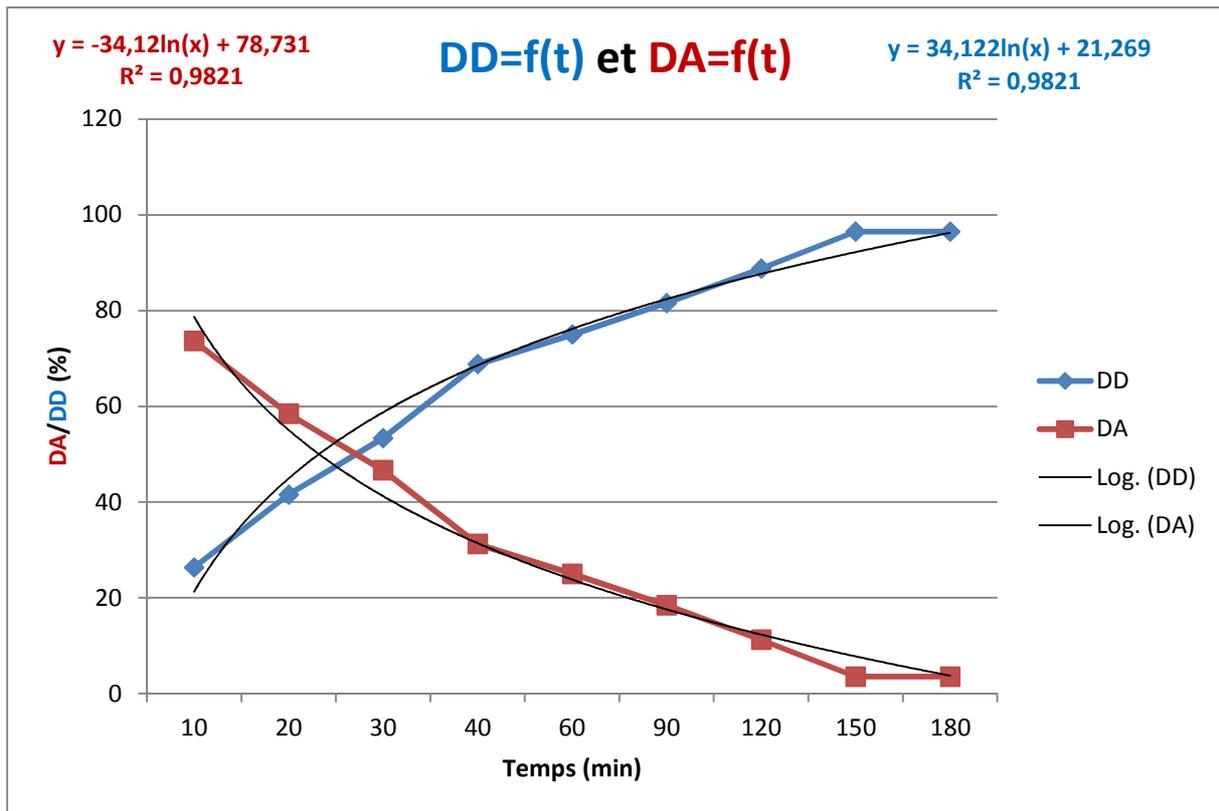


Figure IV.10 : DD=f(t) et DA=f(t)

#### IV.1 .2.2. Préparation des chitosanes avec différents degrés d'acétylation :

Les conditions opératoires :

- Ratio chitine/NaOH = 1/15
- [NaOH] = 40%
- Température = 110°C

Le facteur temps varie en fonction du degré d'acétylation souhaité : 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%.

code chitosane	DD théorique	Temps de préparation	DD expérimentale
CHIT 20	20	5min 30 sec	17,7688739
CHIT 40	40	19 min 30 sec	33,4447735
CHIT 60	60	35 min	54,474464
CHIT 80	80	78 min	83,3656939
CHIT 100	100	240 min	97,6531858

Tableau n°8 : les DD théorique et expérimentales.

## IV.2. Caractérisation physicochimique :

### IV.2. 1. Identification de la chitine par FTIR spectroscopie :

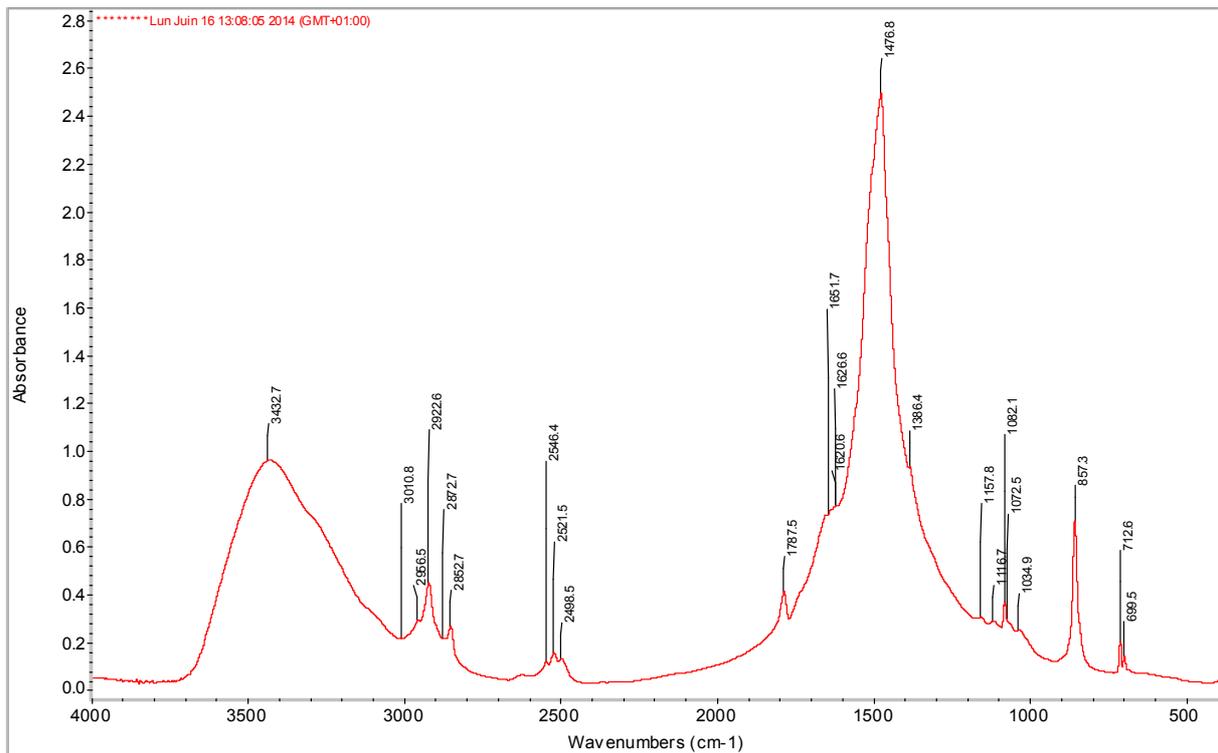


Figure 11 : spectr FTIR .

**Première étape de l'interprétation:**

La structure moléculaire de chaque une des bandes d'absorption significatives a été déterminé selon le tableau suivant :

<b>Bandes d'absorption cm<sup>-1</sup> de la Chitine préparée</b>	<b>Attribution</b>
<b>3432.67</b>	Elongation de la liaison N-H et O-H
<b>2922.58 et 2852.68</b>	Vibrations d'élongation des liaisons C-H dans le groupement CH <sub>2</sub> ou CH <sub>3</sub>
<b>1377</b>	Vibration de déformation de la liaison C-H dans le groupement CH <sub>3</sub>
<b>1420 et 1476.85</b>	Vibration de déformation de la liaison C-H dans le groupement CH <sub>2</sub>
<b>1653</b>	Vibration de valence de C=O (Amide I)
<b>1558</b>	Vibration de déformation de la liaison N-H (Amide II)
<b>1315</b>	Vibration de valence de la liaison C-N
<b>1076 et 1157</b>	Vibration de valence de la liaison C-O-C
<b>1082.09</b>	Vibration de valence de la liaison C-OH

**Tableau n° 9 : interprétation du spectr IR.**

**Deuxième étape de l'interprétation :**

Le spectre infrarouge a été comparé à la base de donnée « Hummel Polymer Sample Library » et à la base de donnée « Sigma Biological Sample Library » à l'aide du logiciel de traitement

des spectres infrarouge « OMNIC » , le traitement des données a été effectué au laboratoire de « génie des procédés industrielle » a la faculté génie mécanique et génie des procédé, USTHB. La ressemblance entre le spectre IR de notre chitine présente 73.22 % de ressemblance aux spectres répertoriés dans les deux bases de données.

Donc le produit extrait est de la chitine.

#### **IV.2. 2. Détermination du DA des chitosanes préparé :**

Le DA a déjà été déterminé par potentiométrie dans la partie **IV.I .II.2.**

#### **IV.2. 3. Détermination des caractères :**

##### **IV.2. 3. 1. Aspect et solubilité :**

<b><u>N° du teste :</u></b>	<b><u>Teste :</u></b>	<b><u>Résultat :</u></b>	<b><u>Conformité :</u></b>
<b>1</b>	Odeur	très légère	<b>Conforme</b>
<b>2</b>	Saveur	aucune	<b>Conforme</b>
<b>3</b>	couleur	blanche	<b>Conforme</b>
<b>4</b>	Solubilité dans les milieux aqueux	pratiquement insoluble	<b>Conforme</b>
<b>5</b>	Solubilité dans les milieux organiques	pratiquement insoluble	<b>Conforme</b>

**Tableau n° 10 : Résultats des tests Aspect et solubilité.**

##### **IV.2. 3. 2. Détermination de la pureté :**

Code chitosane	teneur en matières soluble (%)
CHIT 0	0.19
CHIT 20	0.11
CHIT 40	0.37
CHIT 60	1.47
CHIT 80	1.71
CHIT 100	2.96

**Tableau n° 11 : Résultats du test de la pureté .**

Touts les produits sont conformes car leurs teneur en matières soluble ne dépassent pas 5%.

**Remarque :** nous avons remarqué, plus le degré de désacytilation augmente plus la teneur en matières soluble est importante. Ce qui est très logique sachant que la solubilité du chitosane augmente en fonction du degré de désacytilation.

**IV.2. 4. Aisés de matière première selon la pharmacopée européenne, et étude de sa conformité à la formulation pharmaceutique et alimentaire:**

**IV.2.4. 1. Perte a la dessiccation :**

Code chitosane	perte de poids (%)
CHIT 0	6.51
<b>CHIT 20</b>	<b>14.22</b>
CHIT 40	9.34
CHIT 60	6.81
CHIT 80	6.98
CHIT 100	8.45

**Tableau n° 12 : Résultats du test de la Perte a la dessiccation .**

Tous les produits sont conformes à l'exception du « CHIT 20 » car sa perte de poids est supérieure à 10%.

**Explication :** la non-conformité du chitosane « CHIT 20 » n'est pas due au procédé de préparation car son efficacité est prouvée par la conformité de tous les autres produits, mais ce problème est dû à :

- Une mauvaise manipulation lors des étapes de séchage.
- Une mauvaise conservation : le flacon de conservation n'a pas été correctement fermé.

#### IV.2.4. 2. Cendres :

Code chitosane	taux de cendres (%)
CHITINE	0.77
CHIT 20	0.86
CHIT 40	0.69
CHIT 60	0.29
CHIT 80	0.7
CHIT 100	0.41

**Tableau n° 12 : Résultats du test des Cendres.**

Le taux de cendres totales n'a pas dépassé les 3% donc tous les produits préparés sont conformes.

**Remarque :** le test de calcination est encore une fois preuve de l'efficacité de notre plan d'expériences lors de l'optimisation de l'étape de déminéralisation.

# **Conclusion générale**

## Conclusion générale :

Dans ce travail nous avons pu aboutir à l'élaboration d'une gamme de biomolécules biologiquement active, à partir d'une matrice marine qui est l'os de seiche (*sepia officinalis*), considéré comme un déchet non valoriser et sur le quel très peu d'études ont été effectués.

Tout d'abord, l'extraction de la chitine a été effectuée par la méthode chimique en deux étapes principales dont les paramètres ont été optimisés par deux plans d'expérience factoriel complet à deux niveaux et à 3 facteurs, la première est la déminéralisation qui a présenté le rendement maximal à une concentration d'HCl 1N et un ratio 1:15 et d'une durée d'extraction de 30 minutes, la deuxième étape est la déprotéinisation qui a présenté le rendement maximal à une concentration de soude 3N un ratio 1:20 et d'une durée d'extraction de 500 minutes. La chitine extraite a été identifiée par la méthode spectrométrique la plus efficace qui est la spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR).

Ensuite, l'étude cinétique de la réaction de désacétylation de la chitine pour l'obtention du chitosane a été étudiée dans des conditions fixes de ratio et de concentration de soude en faisant des prélèvements à différents intervalles de temps, puis le modèle mathématique de la réaction a été établi.

Enfin, des chitosanes avec différents degrés de désacétylation ont été préparés à partir de chitine extraite et analysés, les degrés de désacétylation (20%, 40%, 60%, 80%, 100%) ont été déterminés par potentiométrie.

Des analyses de contrôle qualité ont été effectuées (Aspect organoleptique, solubilité, pureté, perte à la dessiccation et cendres) afin de valider la conformité de tous les principes actifs préparés pour leur utilisation dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire selon les rigueurs de la pharmacopée européenne et *Handbook of Pharmaceutical Excipients*.

# **Bibliographie**

- 1- SEAFISH, 2011
- 2- NIANG, 1992
- 3- Dickel et al,200.agin et al ;,2006
- 4- Mangold et al.;1989 .Rocha et al. ; 2001 perrin,2004
- 5- Boletzky , 2003
- 6- BAY-NOUAILHAT, 2005
- 7- bay\_nouailhat 2005
- 8- bay\_nouailhat 2005
- 9- FAO, 1988
- 10- Roper et al., 1984
- 11- d'après Najai, 1983, cité dans Boucaud-Camou, 1990
- 12- Beaumont & Cassier 1981
- 13- Boucaud-Camou, 1990
- 14- Roper et al., 1984
- 15- Grassé, 1984
- 16- Opalesurfcasting.net, 2012
- 17- Budelmann et al., 1990, cité par Boucaud-Camou, 1990
- 18- F.A.O., 2000. URL n°3
- 19- F.A.O., 2000. URL n°3
- 20- F.A.O., 2000. URL n°3
- 21- F.A.O., 2000. URL n°3
- 22- F.A.O., 2000. URL n°3
- 23- Boucaud-Camou, 1990
- 24- Wikipedia.fr, 2012
- 25- Forum de la vache sous-marine, 2008
- 26- Opalesurfcasting.net, 2012
- 27- Forum de la vache sous-marine, 2008
- 28- No HK, Meyers SP, Preparation and characterization of chitin and chitosan (A review). J Aquatic Food Product Technol, 4 (1995) 27-52
- 29- Jaouen D, Chitine, Chitosane et Dérivés. PhD Thèse en pharmacie, Université d'Angers, Angers (France), (1994).
- 30- Muzzarelli, R.A.A. Chitin; Pergamom : Oxford, (1977).
- 31- Peter M.G, Chitin and chitosan from animal sources. Biopolym, 6 (2002) 481-574.
- 32- Roberts GAF, Chitin Chemistry, Macmillan, London, (1992).

- 33- Tolaimate A., Desbrieres J., Rhazi M., Alagui A, Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polym.*, 44 (2003) 7939- 7952.
- 34- Shahidi F and Abuzaytoun, R, Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, productions, applications, and health effects. *Adv. Food Nutr. Res.*, 49 (2005) 93-135.
- 35- Shahidi F., J.K.V. Arachi and Y.J. Jeon, Food applications of chitin and chitosan. *Trends Food Sci. Tech.*, 10 (1999) 37-51.
- 36- . Tolaimate A., J. Desbrieres, M. Rhazi and A. Alagui, Contribution to the preparation of chitin and chitosan with controlled physico-chemical properties. *Polym*, 44 (2003) 7939 – 7952.
- 37- R. Vieira, E. Guibal, E.A. Silva, M. Beppu, Adsorption and desorption of binary mixtures of copper and mercury ions on natural and crosslinked chitosan membranes, *Adsorption* 13 (2007) 603–611
- 38- K. Kurita, Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans, *Mar. Biotechnol.* 8 (2006) 203–226.
- 39- Baldwin E.A., Nisperos-carriedo M.O, and Baker R.A, Use of edible coating to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Food Science and Nutrition*, 35 (6) (1995) 509-523.
- 40- Roberts G.A.F, Structure of chitin and chitosan. In: *Chitin chemistry*, edited by G.A.F. Roberts, Mac Millan Press, Houndmills. (1992) 1-53.
- 41- Caroline C., Rachel A et Marguerite R, Synthèse et étude d'hydrogels thermosensibles obtenus par modification chimique contrôlée du chitosane. *L'actualité chimique* N° 294–février, (2006).
- 42- Jalal Zohuriaan-Mehr M, Advances in Chitin and Chitosan Modification through Graft Copolymerization, *Iranian Polymer Journal* 14 (3) (2005) 235-265.
- 43- H.K.NO, K.S. Lee, S.R. Meyers, Correlation between physicochemical characteristics and binding capacities of chitosan products. *JFS: Journal of Food science – Vol.65, N° 7*, (2000).
- 44- Nugraha E, Développement de films biodégradables à base de chitosane: Etudes du mélange chitosane/PLA, de la plastification et de la compatibilisation. Thèse de doctorat, Université de Reims, juin (2006).
- 45- Jalal Zohuriaan-Mehr M, Advances in Chitin and Chitosan Modification through Graft Copolymerization, *Iranian Polymer Journal* 14 (3) (2005) 235-265.
- 46- Chatelet C., Damour O and Domard A, Influence of the degree of acetylation on some Biological properties of chitosan Films. *Biomater.* 22 ( 2001) 261-268.

- 47- Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F.M., Argüelles-Monal W., Desbières J and Rinaudo M, An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polym*, 42 (2001) 3569-3580.
- 48- Kasaai M. R., Arul J, Chin S. L. and Charlet G, The use of intense femtosecond laser pulses for the fragmentation of chitosan. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 120 (1999) 201-205.
- 49- Heux L., Brugnerotto J., Desbrieres J., Versali M.F. and Rinaudo M, Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromol*, 1 (2000) 746-751.
- 50- Maghami G. G., and Roberts G. A. F., Evaluation of the viscometric constants for chitosan. *Die Makromolekulare Chemie*, 189 (1) (1988) 195-200.
- 51- Chen R.H., Chang J. R. and Shyur, J. S., Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan. *Carbohyd. Res*, 299 (1997) 287-294.
- 52- Yang B.Y. and Montgomery R, Degree of acetylation of heteropolysaccharides. *Carbohydr. Res*, 323 (2000) 156-162.
- 53- Rinaudo M., G. Pavlov and J. Desbrieres, Influenced of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polym*. 40 (1999)7029-7032.
- 54- Khan T. A., Peh K. K, Mechanical bioadhesive strength and biological evaluation of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmaceutical and Pharmaceutical Science*, 3(3), H. S. (2000) 3003–3371.
- 55- Rinaudo. M, Milas M and Pham Le Dung, Characterisation of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int. J. Biol. Macromol* ,15 (1993) October.
- 56- Peter M.G, Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *J.M.S.-Pure Appl. Chem*,A32 (1995) 629-640.
- 57- Wang W. and D. Xu, Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degree of deacetylation, *Int. J. Biol. Macromol*, 16 (3) (1994) 149-152.
- 58- Pejic B, Vukcevic M, Kostic M, Skundric P, Biosorption of heavy metal ions from aqueous solutions by short hemp fibers: effect of chemical composition, *J. Hazard. Mater*. 164 (2009) 146–153.
- 59- Berth, G., H. Dautzenberg et M. G. Peter, Physico-chemical characterization of chitosans varying in degree of acetylation. *Carbohydrate Polymers*, 36 (1998) 205-218.

- 60- Zemmouri H, Utilisation du chitosane comme agent flocculant dans le traitement des eaux usées. Thèse de Magister, Laboratoire de Biotechnologie Environnementale et Génie des procédés, Ecole national polytechnique, Alger (2008).
- 61- M.L Duarte, M.C. Ferreira, M.R. Marvao, Joao Rocha, An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosane by FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules* 31 (2002) 1-8.
- 62- Li J-M, Meng X-G, Hu C-W, Du J, *Bioresour Technol* (2009);100:1168.
- 63- Ayer B, Elvan Y, Nesrin H, Evaluation of chitosan as potential medical iron (III) ion adsorbent, *Turk J Med Sci* 30 (2000) 341-348.
- 64- Grégorio C, Pierre-Marie B, Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies, *Prog. Polym. Sci.* (2007).
- 65- Khanafari, A., Marandi, R., & Sanatei, Sh. (2008). Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 5(1), 19e24.
- 66- Li, Q., Dunn, E. J., Grandmaison, E. W., & Goosen, M. F. A. (1992). Applications and properties of chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 7(4), 370e397.
- 67- Limam, Z., Selmi, S., Sadok, S., & El-abed, A. (2011). Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: biological and physico- chemical properties. *African Journal of Biotechnology*, 10(4), 640e647.
- 68- K. Kurita, Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans, *Mar. Biotechnol.* 8 (2006) 203–226.
- 69- Valentin DURAND et Thomas VERGINI, Le chitosane – un biopolymère d'avenir pour les papiers antimicrobiens ? Cas des emballages alimentaires, Mai 2010
- 70- Mukherjee, D. P. (2002). Method for producing chitin or chitosan. United State Patent,
- 71- 6,310,188.
- 72- M.S. Benhabiles, R. Salah, H. Lounici, N. Drouiche, M.F.A. Goosen, N. Mameri
- 73- Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared

from shrimp shell waste, Food Hydrocolloids 29 (2012) 48e56

74- Rinaudo, M ; G ; Palvro ; J Desbrieres, 1999. influenced of acetic acid concentration on the solubilization of chitosane. Polym. 40,7029-7032.

75- COEI-1-CHITOS:2009, chitosane, CODEX OENOLOGIQUE INTERNATIONAL.

76- Aruldhason Barwin Vino, Pasiyappazham Ramasamy, Vairamani Shanmugam, Annaian Shanmugam, Extraction, characterization and in vitro antioxidative potential of chitosan and sulfated chitosan from Cuttlebone of Sepia aculeata Orbigny, 1848 Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine (2012)S334-S341

77- Pearson D, Pin-Chan D, Gow-Chin Y. Action of methanolic extract of mung bean hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. Food Chem Toxicol 1960; 37: 1055-78- 1061.



**Lassal Sarah**

**ENSV 2014**

**(37<sup>eme</sup> promotion)**

**sarahlassa@gmail.com**

### **Résumé :**

Dans ce travail nous avons optimisé l'extraction de la chitine à partir de l'os de seiche (*sepia officinalis*) par la méthode chimique en deux étapes principales dont les paramètres ont été optimisé par deux plan d'expérience factoriel complet à deux niveau et à 3 facteurs, la première est la déminéralisation et la deuxième étape est la deproteïnisation .La chitine extraite a été identifier par spectroscopie FTIR. Ensuite, l'étude cinétique de la réaction de desacytilation de la chitine pour l'obtention du chitosane a été étudiée. Enfin, des chitosanes avec différents degrés de desacytilations ont été préparé puis contrôlé (Aspect organoleptique, solubilité, pureté, perte a la dessiccation et cendres) selon les rigueurs de la pharmacopée européenne et hand book of pharmaceutical excipients. L'intérêt vétérinaire de cette recherche est l'obtention d'une biomolécule ayant des activités biologiques (antifongique, antimicrobien, anti-infectieux) ; agent anti-tumoral; effet hémostatique; favorisation de la croissance du tissu ; stimulation de la prolifération des cellules.

### **Summary:**

In this work we optimized the extraction of chitin from cuttlefish bone (*Sepia officinalis*) by chemical method in two main steps where parameters had been optimized by means of two complete factorial experimental designs with two levels and three factors. the first one is the demineralization and the second step is deproteinization .The extracted chitin was identified by FTIR spectroscopy. Then, the kinetic study of the reaction of chitin desacytilation for obtaining chitosan was studied. Finally, chitosans with different degree of desacytilation were prepared and tested (Aspect organoleptic, solubility, purity, loss on drying and ash) following the standards of the European Pharmacopoeia and hand book of pharmaceutical excipients. The veterinary interest of this research is to obtain a biomolecule having biological activities (antifungal, antimicrobial, anti-infectious); antitumor agent; hemostatic effect; Favoring the growth of tissue; stimulation of cell proliferation.

ملخص:

في هذا العمل الذي تم فيه تحسين استخراج الكيتين من عظام البني الداكن حسب الطريقة الكيميائية على مستويين ب3 عوامل ثم تم استخراج الكيتين و بعدها تحديد طبيعتها بالتحليل الطيفي ثم دراسة الحركية و اخيرا فحص الكتين المعالجة حسب دستور الادوية الاوروبية ,