

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES POLYMERES

Approche pour une modélisation des conditions
expérimentales de traitement d'un sous-produit de la
pêche (Beta chitosane)

Présenté par :

Mlle. MERABIA Zineb Maria

Mr. SAADOUNE Mahfoudh

Encadré par :

Pr. LARIBI Hassiba

Année universitaire 2020/2021

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABBREVIATIONS

RESUME

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE I : Chitosane

1. INTRODUCTION	3
2. CHITINE ET CHITOSANE.....	3
2.1. Sources de chitine	5
2.2. Procédé d'extraction de la chitine	5
2.2.1. Déminéralisation	6
2.2.2. Déprotéinisation.....	6
2.2.3. Blanchiment.....	6
2.3. Production de chitosane par desacétylation	7
2.3.1. Méthode chimique	7
2.3.2. Méthode enzymatique.....	8
3. CARACTERISATION DU CHITOSANE	10
3.1. Degré de désacétylation	10
3.2. Viscosité.....	10
3.3. Masse molaire	11
4. PROPRIETES DU CHITOSANE	11
4.1. Cristallinité.....	11
4.2. Solubilité	12

4.3.	Polyélectrolyte en milieu acide	12
4.4.	Propriétés physico-chimiques	13
4.5.	Propriétés biologiques	13
5.	APPLICATION DU CHITOSANE	14
5.1.	Domaine agroalimentaire	14
5.2.	Domaine biomédical et pharmaceutique	15
5.3.	Domaine cosmétique	17
5.4.	Domaine agricole	18
5.5.	Traitement des eaux	18
5.6.	Autres domaines d'applications	19

CHAPITRE II: Méthodologie des plans d'expérience

1.	DEFINITION DES PLANS D'EXPERIENCES	21
2.	L'INTERET DES PLANS D'EXPERIENCES	21
3.	GENERALITES SUR LES PLANS D'EXPERIENCES	21
3.1.	Réponse	21
3.2.	Facteur	21
3.3.	Domaine expérimental	21
3.4.	Variables centrées réduites	22
3.5.	Matrice d'expérience	22
3.6.	Plan d'expérimentation	22
3.7.	Méthodologie expérimentale	22
4.	STRATEGIE DE LA METHODOLOGIE DE LA RECHERCHE EXPERIMENTALE	
	23	
4.1.	Recherche exploratoire	23
4.2.	Criblage de facteurs (screening)	23
4.3.	Etude quantitative des facteurs	23
4.4.	Etude quantitative des réponses	23

5. CRIBLAGE DE FACTEURS	24
6. ETUDE QUANTITATIVE DES FACTEURS	24
6.1. Matrice factorielle complète 2^K	24
6.2. Matrice factorielle fractionnaire 2^{K-p}	24
7. LES CATEGORIES DES PLANS D'EXPERIENCES	25
7.1. Les plans réduits.....	25
7.2. Les plans complets	25
7.2.1. La Méthode des surfaces de réponses.....	26
7.2.1.1. Définition.....	26
7.2.1.2. Les Modèles de surface de réponse	26
7.2.1.3. Représentation graphique	27
CHAPITRE III: Matériels et méthodes	
1. MATERIELS ET METHODES EXPERIMENTALES.....	28
1.1. Matériels.....	28
2. EXTRACTION DU CHITOSANE	29
2.1. Le prétraitement	29
2.2. La déminéralisation.....	29
2.3. La déprotéinisation.....	29
2.4. La désacétylation.....	30
3. OPTIMISATION DE LA DZSACETYLATION CHIMIQUE DE LA CHITINE.....	30
4. CARACTERISATION DES PRODUITS OBTENUS	32
4.1. Test de solubilité	32
4.2. Détermination du degré de désacétylation	32
4.3. Analyse par spectroscopie Infrarouge IR	32
4.4. Détermination du poids moléculaire	33
5. DETERMINATION DES PARAMETRES OPTIMAUX DE LA DESACETYLATION DE LA CHITINE	34

5.1. Application de la méthode des surfaces de réponses	34
---	----

CHAPITRE IV: Résultats et discussions

1. CARACTERISATION DES PRODUITS OBTENUS	35
1.1. Test de solubilité	35
1.2. Caractérisation par FTIR.....	36
1.3. Détermination de DDA des chitosanes	37
1.4. Détermination du poids moléculaire	37
2. ANALYSE DES RESULTATS PAR LA METHODE DE SURFACES DE REPNSES	38
2.1. Réponse obtenue (DDA%).....	38
2.2. Interprétation des représentations graphiques obtenues par la méthode de surfaces de réponses	38
2.2.1. Variation du DDA en fonction de la concentration en NaOH et du temps d'incubation.....	39
2.2.2. Variation du DDA en fonction de la concentration en NaOH et de la température d'incubation.....	39
2.2.3. Variation du DDA en fonction du temps et de la température d'incubation .	40
2.2.4. Variation du degré de désacétylation en fonction du poids moléculaire	41

CONCLUSION

Références bibliographiques

Annexe

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre profonde gratitude tout d'abord à « الله » de nous avoir donné le courage, la volonté et la force pour réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier profondément notre encadreur Pr. LARIBI Hassiba, d'avoir accepté de diriger ce travail, pour la confiance qu'il nous a accordé, merci pour avoir toujours été disponible pour être à notre écoute, pour nous avoir guidée tout en nous laissant libre dans notre choix.

Nous tenons également à remercier vivement M^{me}. SAADOUNE Zineb pour sa contribution et sa précieuse aide.

Nous tenons à transmettre nos vifs remerciements aux présidents de jury et membre examinateur pour notre soutenance. Nous les remercions pour toutes leurs critiques constructives.

Nos remerciements vont également à tous les enseignants du département de Génie des procédés.

Nous ne terminerons pas sans remercier nos familles ainsi que tous ceux qui nous ont apporté l'aide de près ou de loin afin d'accomplir au mieux cette étude.

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : (a) Chitine et (b) Chitosane	4
Figure 1.2 : Désacétylation chimique de la chitine.....	8
Figure 1.3 : Désacétylation enzymatique de la chitine	8
Figure 1.4 : procédé de la fabrication de chitine et chitosane	9
Figure 1.5 : Protonation du chitosane	12
Figure 2.1: Plan de type poupées russes	26
Figure 2.2 : Expérimentation séquentielles	27
Figure 3.1 : Photographie des plumes de calamar	28
Figure 3.2 : Les plumes de calamr après broyage.....	29
Figure 3.3 : La chitine des plumes du calamar	30
Figure 3.4 : β -chitosane extrait à partir des plumes du calamar obtenue par la méthode de surfaces de réponses.....	31
Figure 4.1 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°1	36
Figure 4.2 : Courbe de l'évolution du DDA en fonction de la concentration en NaOH et du temps d'incubation.....	39
Figure 4.3 : Courbe de l'évolution du DDA en fonction de la concentration en NaOH et de la température d'incubation.	40
Figure 4.4: Courbe de l'évolution du DDA en fonction du temps et de la température d'incubation.	41
Figure 4.5 : Variation du poids moléculaire en fonction du DDA	41

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 :Applications du chitosane dans les domaines biomédical et pharmaceutique.	16
Tableau 1.2: Applications du chitosane dans le domaine de l'environnement	19
Tableau 1.3 : autres domaines d'applications du chitosane	20
Tableau 3.1 : Matrice de surfaces de réponses utilisée pour la désacétylation de la chitine.	31
Tableau 4.1 : Test de solubilité des plumes de calamar désacétylées.....	35
Tableau 4.2 : Résultats obtenus après calcul des DDA	37
Tableau 4.3 : Résultats obtenus après calcul des PM	38

LISTE DES ABBREVIATIONS

AA : Acide acétique.

a : Constante de Mark-Houwink.

C : Celsius.

DA : Degré d'Acétylation.

DDA : Degré De Désacétylation.

Eq : Équation.

FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy.

IR : Infra rouge.

KDa : Kilo Dalton.

PM : Poids Moléculaire.

[η] : Viscosité intrinsèque.

η_{inh} : Viscosité inhérente.

η_{rel} : Viscosité relative.

RESUME

Les coproduits de la pêche sont riches en composés pouvant être récupérable (minéraux, protéines, lipides, chitine). La chitine, qui représente 17 à 33% de ces coproduits, peut être transformée en chitosane, composé à grande valeur commerciale.

L'objectif de cette étude est d'optimiser la préparation du β -chitosane, principal dérivé de la chitine extrait à partir des plumes de calamar par un procédé chimique impliquant la déminéralisation, la déprotéinisation, et la désacétylation. Cette optimisation est réalisée en ayant recours à un plan d'expérience de type méthode de surfaces de réponses, tout en utilisant des conditions douces pour le traitement des plumes de calamar afin d'obtenir, d'une part, un chitosane de haut degré de désacétylation, et d'autre part, une préservation écologique par le biais de la valorisation des déchets et l'utilisation minimale des réactifs chimiques.

Le chitosane dérivé de la chitine traitée dans des conditions optimales de concentration de NaOH de 80%, une température de 120° C et une durée de réaction de 2 h à donner une valeur élevée de DDA% 97,14%.

Mots-clés : β -chitosane, DDA, valorisation, chitine, optimisation.

ABSTRACT

The co-products of fishing are rich in compounds that can be recovered (minerals, proteins, lipids, chitin). Chitin, which represents 17 to 33% of these coproducts, can be transformed into chitosan, a compound with high commercial value.

The objective of this study is to optimize the preparation of β -chitosan, the main chitin derivative extracted from squid feathers by a chemical process involving demineralization, deproteinization, and deacetylation. This optimization is achieved by using a response surface method experimental design, while using mild conditions for squid feather processing in order to obtain, on the one hand, a chitosan with a high degree of deacetylation, and on the other hand, ecological preservation through waste recovery and minimal use of chemical reagents.

The chitosan derived from chitin treated under optimal conditions of NaOH concentration of 80%, a temperature of 120° C and a reaction time of 2 h to give a high value of DDA% 97.14%.

Keywords : β -chitosan, DDA, recovery, chitin, optimization.

ملخص

المنتجات المساعدة لمصايد الأسماك غنية بالمركبات التي يمكن استعادتها (المعادن والبروتينات والدهون والكيوتين). يمكن تحويل الكيوتين، الذي يمثل 17 إلى 33% من هذه المنتجات المشتركة، إلى كيتوزان، وهو مركب ذو قيمة تجارية كبيرة.

الهدف من هذه الدراسة هو تحسين تحضير البيتا-كيتوزان، وهو مشتق الكيوتين الرئيسي المستخرج من ريش الحبار بعملية كيميائية تتضمن نزع المعادن، ونزع البروتين، ونزع الأسيثيل. يتم تنفيذ هذا التحسين من خلال اللجوء إلى تصميم أسلوب نوع التجربة لأسطح الاستجابة، مع استخدام ظروف معتدلة لمعالجة ريش الحبار من أجل الحصول على درجة عالية من الكيتوزان، نزع الأسيثيل، والحفاظ على البيئة من خلال استعادة النفايات والحد الأدنى من استخدام الكواشف الكيميائية.

الكيتوزان المشتق من الكيوتين المعالج في ظل الظروف المثلى لتركيز هيدروكسيد الصوديوم بنسبة 80% ودرجة حرارة 120 درجة مئوية وزمن تفاعل ساعتين لإعطاء قيمة عالية لـ DDA %97.14.

الكلمات الرئيسية: DDA ، البيتا-كيتوزان ، الانتعاش ، الكيوتين ، التحسين.

INTRODUCTION GENERALE

Il existe une très grande diversité de bio-polymères issus des produits marins, parmi lesquels on trouve la famille des polysaccharides tels que l'alginate de sodium et le chitosane. Ces bio-polymères constituent une alternative intéressante dans le cadre du remplacement des polymères issus de la pétrochimie, car ils possèdent des propriétés physicochimiques et biologiques importantes [1]. Ces propriétés trouvent des applications ciblées dans des domaines très variés notamment dans les secteurs de l'agriculture, pharmaceutique et biomédicale [2].

Ce polymère est aujourd'hui principalement extrait de la carapace des crevettes ou des crabes, ainsi que des plumes de calamar, les sépions.

Suite au procédé de désacétylation, le chitosane devient riche en groupements amine hautement réactifs, ceci fait du degré de désacétylation un paramètre important vu qu'il affecte les propriétés physico-chimiques [3].

Le pourcentage de désacétylation correspond à la quantité relative de groupements acétyles retirés à la molécule de chitine lors de la préparation du chitosane. Il a une très grande influence sur ses propriétés et ses possibilités industrielles.

[3, 4] Les paramètres comme la concentration en NaOH, la température et le temps influent sur le degré de désacétylation [3].

L'examen de ces variables une à la fois prend du temps et les résultats donnent un grand nombre d'expériences à réaliser ainsi qu'un grand nombre de données à analyser. Ceci ne permet pas de rassurer les interactions entre ces variables. En conséquence, la méthodologie des plans d'expériences, qui est une approche statistique et d'analyse, offrent un moyen simple et efficace de réduire le coût et d'augmenter la robustesse des études expérimentales effectuées lors de la conception ou de la validation d'un produit industriel. Ils permettent d'utiliser toute la connaissance du produit dont le concepteur peut disposer a priori tout en contrôlant un ou plusieurs paramètres à la fois. Ainsi, il y aura une économie de temps, d'effort et de produits.

Dans cette étude, la méthodologie des plans d'expériences a été utilisé, pour surmonter les limites d'une variable à la fois et pour décrire adéquatement l'effet de plusieurs facteurs de limitation ainsi que leurs interactions.

L'objectif de cette étude consiste à optimiser les paramètres de la désacétylation des bio-polymères extrait des plumes de calamar, en utilisant les plans d'expériences, en étudiant

l'effet de trois facteurs sur le degré de désacétylation et le poids moléculaire ainsi que la solubilité.

Le manuscrit de ce travail se compose de quatre chapitres principaux :

Le premier chapitre consiste à présenter des généralités sur les bio-polymères. Il comporte par une étude bibliographique sur la chitine et le chitosane en détaillant leurs structures chimiques, leurs propriétés physico-chimiques, leurs procédés d'extraction ainsi que leurs applications.

Le second chapitre est consacré à une mise au point bibliographique sur les méthodes d'expérimentation basées sur l'utilisation des plans d'expériences.

Dans le troisième chapitre nous allons décrire la technique de l'extraction de la chitine ainsi que le procédé de désacétylation pour former le chitosane avec la méthode des plans d'expériences appliquée afin d'optimiser les paramètres d'extraction.

Le quatrième et dernier chapitre est consacré à la présentation des résultats et leurs discussions.

Enfin, on terminera par une conclusion générale qui résume les résultats essentiels obtenus et réalisés lors du travail expérimental.

1. INTRODUCTION

Selon l'agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie (l'ADEME), les biopolymères sont des polymères naturels issus de ressources renouvelables de plantes, d'algues ou d'animaux. Selon cette définition trois grandes classes sont alors répertoriées : les polysaccharides, les protéines et la lignine [5].

Les polysaccharides peuvent être les matériaux de demain qui seront pleinement utilisés quand les ressources en pétrole commenceront à se tarir. Ces polymères sont, en effet, des substances uniques dans le sens où elles sont naturelles, abondantes, issues de ressources renouvelables et exploitables dans de nombreux pays. Ils présentent de nombreuses propriétés à la fois physico-chimiques et biologiques. Ces ressources sont par nature biodégradables puisqu'elles sont d'origine naturelle. Les polysaccharides peuvent être d'origine végétale (cellulose, amidon, alginates, carraghénanes), animale (chitine et chitosane) ou bactérienne (xanthane, gellane). Chaque année, la terre en produit mille milliards de tonnes [6].

D'un point de vue chimique, les polysaccharides, nommés aussi polyoside ou polyholosides, sont des biopolymères hydrophiles et stables, formés par condensation d'un grand nombre de molécules d'oses, soit toutes identiques (homopolyosides), soit de types différents (hétéropolyosides) [5, 7].

Les polysaccharides sont d'un grand intérêt pour l'homme et ont de nombreuses applications industrielles et pharmaceutiques. Dans notre travail, nous intéressons au chitosane; biopolymère possédant des propriétés physico-chimiques intéressantes (Degré D'acétylation DD%...etc.) [2, 8].

2. CHITINE ET CHITOSANE

La chitine est une fibre naturelle de nature cristalline de la famille des polysaccharides azotés. La formule chimique de la chitine est très proche de celle de la cellulose, la seule différence entre les deux structures est la présence de l'acétamide sur le C₂ dans la chitine remplacée par l'hydroxyle dans la cellulose (**Figure 1.1**). Sa structure chimique est un enchaînement d'unité monomère N-acétyle- β -Dglucopyranose reliées par une liaison glycosurique β -(1-4).

A l'état solide, la chitine se trouve en trois formes polymorphiques α , β , γ qui diffèrent dans leur degré d'hydratation, de la taille de la maille, et du nombre de chaînes de chitines par maille [9].

Chitine est généralement isolé des exosquelettes de crustacés et plus particulièrement des crevettes et des crabes où α -chitine isomorphe est produit [10]. α -Chitine a une structure étroitement compacte en raison de sa structure cristalline dans laquelle antiparallèle favorisent une forte liaison hydrogène [11]. Calmar est une autre source importante de chitine dans laquelle il existe dans le β -isomorphe qui a été montré une solubilité plus élevée, une réactivité plus élevée et une affinité plus élevée vers les solvants et l'enflure que α -chitine. Ces caractéristiques sont dues à une liaison intermoléculaire plus faible de l'hydrogène imputable à l'arrangement parallèle des chaînes principales [12]. γ -Chitine, un tiers chitine allomorphe, a également été décrit [13, 14], mais à partir d'une analyse, il semble qu'il ne s'agit que d'une variante de la famille [15].

Le chitosane est un polysaccharide cationique, semi-cristallin très peu répandu dans les sources marines [16], il provient essentiellement de la désacétylation de la chitine. Il possède une chaîne linéaire des unités répétitives de 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose et 2-acétamido-2-deoxy-D-glucopyranose, liées par des liaisons osidiques de type β (1 \rightarrow 4), dont le degré de désacétylation est supérieur à 50%. Le chitosane est un matériau naturel avec un aspect solide floconneux, blanc et inodore de haut poids moléculaire, non toxique, renouvelable, biodégradable et biocompatible. Il possède également une réactivité chimique et biologique importante. Il présente aussi des propriétés diverses telle que la chélation, le pouvoir filmogène et la capacité d'adsorption.

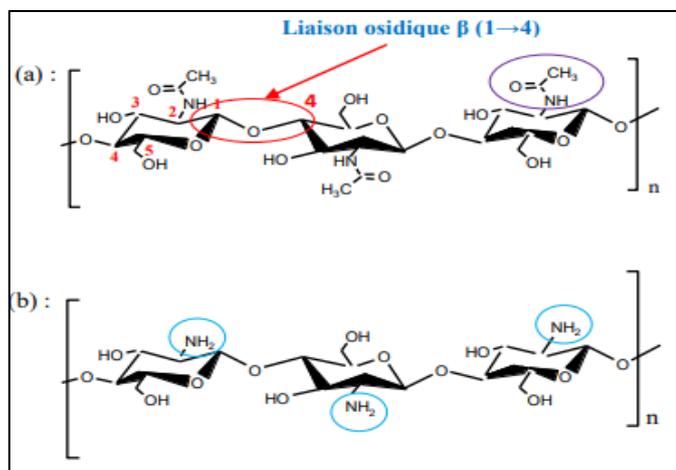


Figure 1.1 : (a) Chitine et (b) Chitosane [7].

En générale la structure de la chitine et du chitosane son défini structurellement par trois principaux groupements fonctionnels réactifs, dans les quels sont identiques au niveau des groupements hydroxyles primaires et secondaires sur le carbone C₃ et le carbone C₆, et se diffère au niveau des groupements en position C₂, acétamide pour la chitine et amine pour le chitosane (**Figure 1.1**).

Ces derniers sont également caractérisés par la fraction des groupements N-acétamide résiduels appelée degré d'acétylation, noté DA. Dans le cas du chitosane, on préfère utiliser le degré de désacétylation, noté DDA qui correspond à la quantité relative des groupements acétyles retirer à la macromolécule de la chitine lors de la préparation du chitosane [17, 18]. La nature chimique du chitosane fournit beaucoup de possibilités alternatives pour les modifications covalentes et ioniques qui permettent l'ajustement étendu des propriétés chimiques, mécaniques et biologiques. Étant donné que ce sont des polymères, la chitine et le chitosane sont connus par la longueur de leurs chaines d'une masse moléculaire (MM) exprimé en poids (MW) et en nombre (MN) [19, 20].

2.1. Sources de chitine

La chitine est le polysaccharide naturel, facile à obtenir et renouvelable. Dans le règne animal, la chitine est un élément structurel important du tégument de certains invertébrés. Elle est présente principalement dans les coquilles de mollusques, dans les cuticules des insectes et dans la carapace des crustacés [21].

Dans le règne végétal, la chitine se trouve dans la paroi de la plupart des champignons et de certaines algues chlorophycées. En plus de son rôle dans le maintien de la rigidité de la cellule, elle contribue au contrôle de la pression osmotique la chitine est présente, aussi, dans certaines levures et bactéries.

2.2. Procédé d'extraction de la chitine

La faible teneur de la chitine dans les organismes tels que les insectes et les champignons, laisse à suggérer que les crustacés sont les principales sources fournissant cette matière première (chitine) [22].

De nombreuses méthodes ont été développées afin de préparer la chitine à partir des calamars. Parmi ces méthodes, les méthodes chimiques sont les plus utilisées. L'extraction chimique consiste en déminéralisation acide et une déprotéinisation basique[23].

Les étapes d'extraction de la chitine suivent deux étapes principales, la déminéralisation (éliminer les éléments minéraux) et la déprotéinisation (éliminer les protéines) plus une étape supplémentaire de blanchiment ou de décoloration, suivie par une troisième étape de désacétylation pour obtenir le chitosane.

2.2.1. Déminéralisation

Elle est généralement, réalisée par un traitement acide sous agitation pour solubiliser le carbonate de calcium et le chlorure de calcium. Les acides les plus fréquemment utilisés sont l'acide chlorhydrique et l'acide formique, à des concentrations variables de 1 à 10 mol/L. La durée du traitement acide est de l'ordre de 1 à 48 heures à la température ambiante [24].

2.2.2. Déprotéinisation

A l'état naturel, la chitine se présente en association avec les protéines (chitinoprotéines). Ces protéines sont éliminées par un traitement basique en utilisant des solutions à base de NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO, Ca(OH)₂ ou NaPO₄, à des concentrations variables de 0.1 à 5 mol/L. la solution d'hydroxyde de sodium (10% massique) est la plus souvent utilisée pour solubiliser les protéines. La durée du traitement basique est de l'ordre de 0.5 à 72 heures à des températures (65 à 100°C).

2.2.3. Blanchiment

La présence de certains pigments dans les carapaces donne sa couleur rose-orangé. La décoloration est une étape supplémentaire facultative a pour but de minimiser les fortes interactions entre la chitine et les pigments, en outre, éliminer les pigments résiduels comme les caroténoïdes, elle se fait par des agents oxydants (agent de blanchiment) tels que : KMnO₄, NaOCl, SO₂, NaHSO₃, Na₂S₂O₄, l'acétone, l'éthyle-acétate, l'acide oxalique ou H₂O₂ seule ou mélangé avec du HCl, dont la concentration est comprise entre 0,1 et 33 %. Au cours de cette étape, les agents de blanchiment ne doivent en aucun cas avoir varié les paramètres physicochimiques de la chitine et du chitosane [25].

La chitine est ensuite désacétylée pour obtenir le chitosane.

2.3. Production de chitosane par désacétylation

La désacétylation de la chitine peut être hydrolysée en milieu acide ou basique suivant des mécanismes fondamentalement différents [26]:

Dans un milieu alcalin, deux ions hydroxydes sont nécessaires pour effectuer la désacétylation, au départ, une attaque du premier OH^- sur le carbone acyle de l'amide, suivie par un second OH^- qui déprotonise l'anion intermédiaire tétraédrique résultant, pour former ensuite un di-anion, qui s'effondre à son tour en donnant les produits. A des concentrations basiques faibles inférieures à 35%, la réaction est lente résultant un DDA faible à des températures élevées [26].

Il a été aussi rapporté dans les travaux antérieurs [27, 28] que la chitine a été dissoute dans une solution alcaline relativement diluée, par agitation prolongée selon un procédé homogène et lent à des températures inférieures à 40°C, la désacétylation produisait du chitosane avec une distribution aléatoire parce que la chitine précipite à des températures plus élevées.

Par conséquent, la désacétylation est généralement effectuée à haute température dans des solutions fortement alcalines (50% de NaOH). Lamarque et al. ont pu obtenir un chitosane ayant un DDA et poids moléculaire élevés à partir d'une désacétylation à plusieurs étapes [29]. Cette étape se fait par une hydrolyse des groupements acétyles en groupes aminés. Elle peut être effectuée par deux méthodes chimique et enzymatique [30, 31].

2.3.1. Méthode chimique

Elle se fait par hydrolyse en milieu fortement basique souvent par NaOH ou KOH (concentré à 40-50%) à haute température. Le rendement de la désacétylation alcaline dépend des deux étapes précédentes, de la quantité, la densité et la taille de la chitine [30], elle dépend aussi, des conditions opératoires tels que : la température, le temps réactionnel, la concentration de la base et l'atmosphère (air ou azote). Ce processus suit le schéma réactionnel représenté sur la (**Figure 1.2**) :

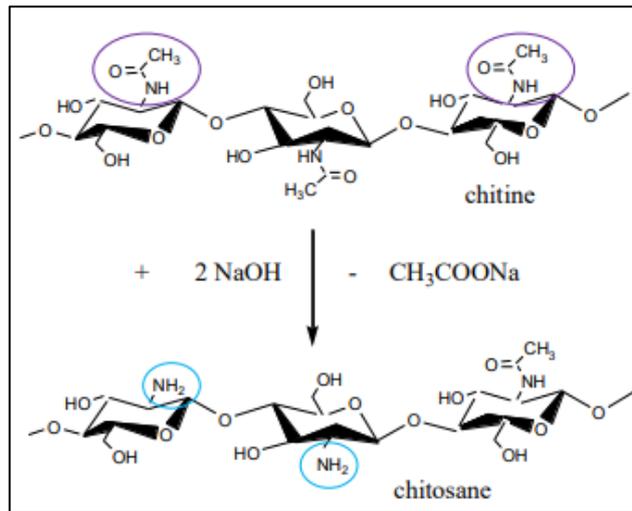


Figure 1.2 : Désacétylation chimique de la chitine.

2.3.2. Méthode enzymatique

Elle utilise des enzymes appelés chitine-désacétylases isolées à partir de nombreux organismes comme des champignons (*Mucor rouxii*, *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum lindemuthianum* et *Azorhizobium caulinodans*).

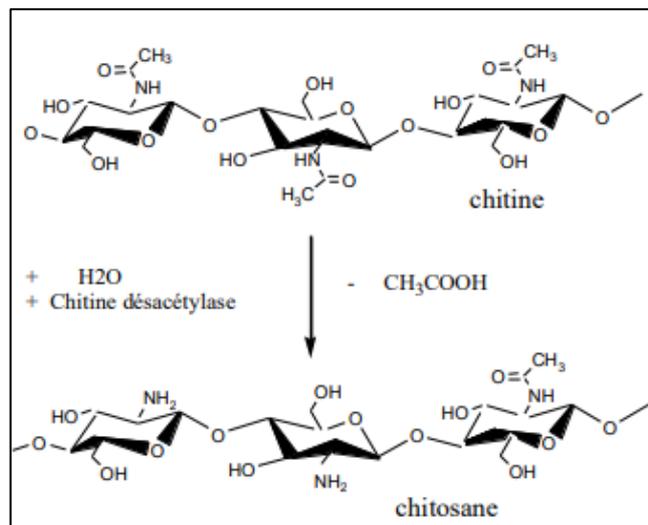


Figure 1.3 : Désacétylation enzymatique de la chitine.

Cette technique est moins utilisée en raison du coût très élevé des enzymes, par conséquent, elle reste peu développée à l'échelle industrielle. Ce processus suit le schéma réactionnel ci-dessus (**Figure 1.3**).

Le chitosane obtenu est filtré, lavé à l'eau distillée jusqu'à la neutralisation, puis il est séché. La désacétylation permet d'obtenir un chitosane avec un degré de désacétylation supérieur

ou égale à 60% avec des propriétés différentes à celles de la chitine, en particulier sa solubilité en milieu acide à $\text{pH} < 6,5$.

La variation des conditions opératoires du traitement notamment la température et le temps de désacétylation permet d'obtenir des différents chitosane à partir d'une même chitine.

Les quatre étapes citées ci-dessus sont souvent empiriques et varient avec le degré de minéralisation des carapaces, les saisons et les conditions de températures[32]. Dans le cas du chitosane, on préfère utiliser le degré de désacétylation, noté DDA qui correspond à la quantité relative des groupements acétyles retirés à la macromolécule de la chitine lors de la préparation du chitosane [33]. Le processus général d'extraction est schématisé dans la (figure 1.4).

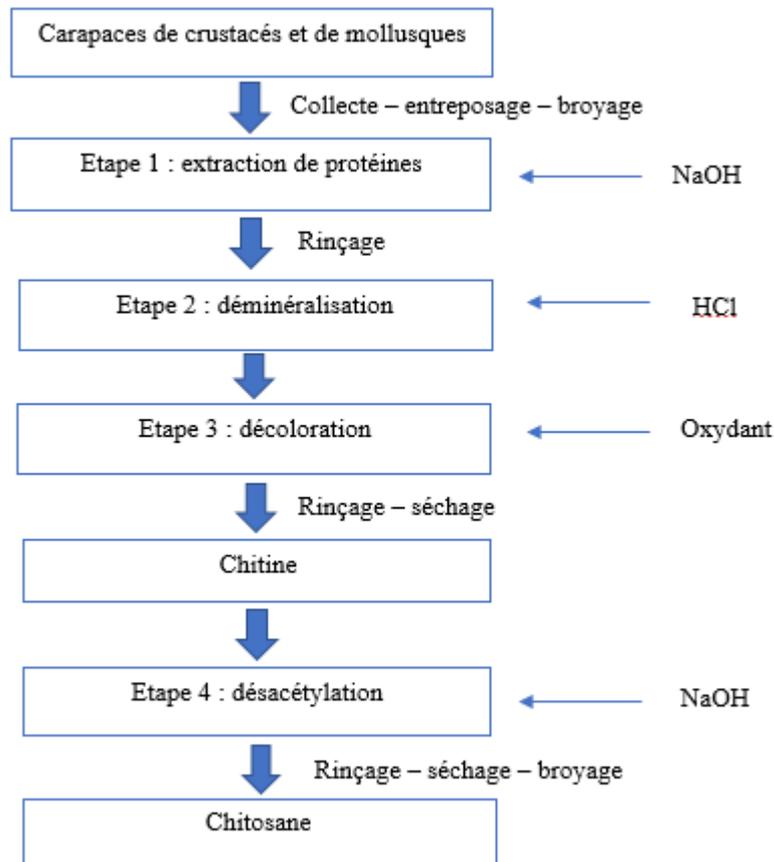


Figure 1.4 : procédé de la fabrication de chitine et chitosane [34].

3. CARACTERISATION DU CHITOSANE

3.1. Degré de désacétylation

Le degré d'acétylation (DA) est défini comme étant la fraction molaire des unités acétylées (unité acétyl glucosamine). Le degré de désacétylation (DDA=1-DA) représente la proportion d'unités amine-D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités glycosidiques[1]. La désacétylation est l'hydrolyse des groupements acétyles présents dans la chitine pour avoir des groupes amines. La présence des groupes acétylés est principalement la seule différence structurelle entre la chitine et le chitosane, ce dernier est de 80% pour la chitine et d'environ 30 % pour le chitosane [18]. Ceci est traduit structurellement par le degré d'acétylation (DA), ou le degré de désacétylation (DDA). Le degré d'acétylation (DA) est le rapport entre la fonction acétylée et celle non acétylée, par contre le degré de désacétylation (DDA) présente la quantité des groupements acétylés disparus dans la chitine, c'est la caractéristique la plus importante du chitosane, en matière de ses propriétés physico-chimiques, sa biodégradabilité et son activité biologique [3]. Le DDA peut être déterminé par diverses méthodes, par rapport à son état physique à l'état solide : La spectroscopie infrarouge (FTIR) [35], l'analyse élémentaire [36] la résonance magnétique nucléaire du solide (RMN) [37], en solution : par dosage UV [38], par RMN du liquide [38], par titrage colloïdale [39], par titrage volumétrique, par dosage conductimétrique et par pH métrique [29].

3.2. Viscosité

Comme la plupart des polysaccharides, en raison des liaisons glycosidiques β (1- 4), le chitosane est un semi-rigide et augmente fortement la viscosité de la solution. La viscosimétrie est la méthode la plus employée pour déterminer la viscosité, en utilisant la relation de Mark-Houwink et sukurada, connaissant les paramètres a et k [40] :

$$[\eta] = kMa \quad \text{Eq. 1.1}$$

Avec :

$[\eta]$: La viscosité intrinsèque.

M : le poids moléculaire moyen du polymère.

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

La viscosité est une propriété physique caractéristique de tous les fluides, qui émerge de collisions entre des particules de fluide qui se déplacent à des vitesses différentes, ce qui entraîne une résistance à leur mouvement.

La viscosité du chitosane dépend de plusieurs facteurs :

- DDA : plus il est désacétylé, plus il y a de groupes amines libres, plus le chitosane est soluble, et plus sa viscosité est importante.
- MM : la viscosité intrinsèque augmente avec MM.
- La température : la viscosité diminue lorsque la température augmente.
- pH : Plus le pH est bas, plus la viscosité est importante.

3.3. Masse molaire

Les masses molaires du chitosane et la répartition des motifs N-acétylés le long de la chaîne dépendent de la méthode de désacétylation utilisée. Le chitosane commercial a une masse molaire entre 100-500 kDa. Plusieurs méthodes ont été employées pour la détermination de sa masse molaire telle que la méthode viscosimétrique et la chromatographie d'exclusion stérique [40].

4. PROPRIETES DU CHITOSANE

4.1. Cristallinité

La cristallinité est une caractéristique importante du chitosane, elle permet de contrôler la disponibilité et l'accessibilité des sites internes dans le polymère, le gonflement dans l'eau, les réactions de complexation ou encore les propriétés diffusionnelles [41]. Le chitosane se cristallise dans un réseau cristallin orthorhombique sous deux formes connues : chitosane I (sels de faible DDA environ 60%) et chitosane II (amine libre de fort DDA environ 90%), cette cristallinité peut être évaluée par des mesures de diffraction de rayons X. Ogawa et al. ont montré l'existence d'un grand pic de diffraction des cristaux hydratés à $2\theta = 10,4^\circ$ soit $d=8,51 \text{ \AA}$, en plus des cristaux anhydres à $2\theta=15^\circ$ soit $d=5,38 \text{ \AA}$ et un Halo à 20° caractérisant la forme amorphe, ces travaux ont prouvés que la cristallinité augmente avec le DA, autrement dit, une chitine complètement acétylée est plus cristallisée que celle partiellement désacétylée [42, 43].

4.2. Solubilité

Le chitosane possède des fonctions amines primaires, Sorlier et al. ont trouvé un pKa allant de 6,3 à 7,2, soluble seulement dans des solutions acides ($\text{pH} < 6,0$), et insoluble dans l'eau, dans les acides concentrés, les bases et dans les solvants organiques [44]. A pH faible, le chitosane subit une protonation des fonctions amines (en ammoniums) et devient chargé positivement, le chitosane devient alors un polyélectrolyte cationique hydrosoluble, cette protonation explique son gonflement, sa dissolution et la diminution de sa cristallinité. Le chitosane est soluble dans la plupart des acides minéraux dilués comme : HCl, HNO₃, H₃PO₄, il est aussi soluble dans les acides organiques comme l'acide acétique, maléique et lactique, mais insoluble dans les acides ramifiés comme : l'acide citrique, tartrique et l'EDTA [45, 46]. Le CH₃COOH dilué (0,1-1%) est le plus utilisé pour la dissolution du chitosane, selon les réactions présentées sur la figure 1.5. A pH élevé, les amines ne sont plus ionisées et le chitosane se précipite et devient insoluble.

Le chitosane est connu comme le seul polyélectrolyte cationique d'origine naturelle, contrairement aux autres biopolymères qui sont généralement anioniques [47]. Rinaudo et al. ont montré que la solubilité du chitosane dépend du DDA, de la force ionique, du pH et de la nature de l'acide utilisé [48]. Généralement, le chitosane est peu soluble lorsque le DDA est faible. Dash et al. En 2011 ont démontré que le pKa dépend du DDA et de la neutralisation des NH³⁺ [49].

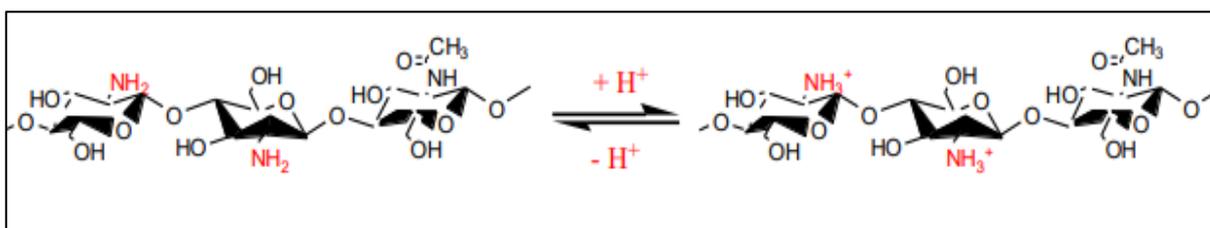


Figure 1.5 : Protonation du chitosane.

4.3. Polyélectrolyte en milieu acide

Le chitosane est considéré comme une polyamine. La présence de la fonction amine primaire en position 2 du noyau glucopyranose, lui confère des propriétés physico-chimiques remarquables. Ces propriétés dépendent fortement du pH du milieu et de la présence ou non du sel. En absence de sel, le pK₀ de la fonction amine est de 6,5. Ce qui signifie qu'en dessous de ce pH, le chitosane devient un polycationique, ce qui le distingue des autres polymères

naturels qui sont généralement anioniques [21]. C'est un avantage que possède le chitosane contrairement à la majorité des polysaccharides. Il peut alors s'associer sélectivement avec des espèces anioniques et être ainsi un excellent agent de floculation et former des complexes polyanion - polycation. Au-delà d'un pH de 6,5 environ, le chitosane complexant des métaux lourds en particulier. La chaîne macromoléculaire ne comporte plus de groupements ionisés. Le polymère possède alors de bonnes propriétés chélatantes dues, en particulier, au doublet électronique libre de l'atome d'azote. Par chauffage, le chitosane se décompose sans fondre à partir de 185 °C [50].

4.4. Propriétés physico-chimiques

Le chitosane est parfaitement stable [51] en phase solide. Il est en équilibre avec la pression atmosphérique normale et sa teneur en humidité se situe entre 10 et 14 %. C'est un matériau non-poreux ayant des formes physiquement modifiées [21]. Grâce à sa structure chimique particulière, le chitosane est apte à interagir avec d'autres substances chimiques (ions, molécules et macromolécules).

Ce comportement est lié :

- i. À son caractère hydrophile dû à la présence des groupes hydroxydes des unités glucoses qui permettent de former des ponts hydrogènes et des liaisons inter ou intramoléculaires.
- ii. À la présence de groupements hydroxyle, acétamide et amine dotés d'une grande réactivité.
- iii. À la structure flexible des chaînes de polymères (fonction du pH et de la température). Le chitosane possède également un important potentiel de rétention d'eau, de chélation d'ions, de complexation et d'adsorption de molécules ou de polymères [18].

4.5. Propriétés biologiques

Le chitosane peut être un substitut des milieux biologiques, du fait que les liaisons glycosidiques et les résidus N-acétyl-glucosamine se retrouvent dans la structure des matrices extracellulaires de la plupart des tissus vivants. Le chitosane est non toxiques et biodégradables. Il est biocompatible et biorésorbable. Il possède un caractère antithermogénique, hémostatique et anti tumorale [21]. Il ne présente, par contre, aucun comportement antigénique. Le chitosane est également antifongique, antibactérien et un très

bon cicatrisant [52] précipite. Il perd ses charges positives, et le doublet électronique de l'azote se libère. Ces doublets libres et la présence de nombreux atomes d'oxygène dans le chitosane lui permettent de se comporter comme un excellent.

5. APPLICATION DU CHITOSANE

Le chitosane est un biopolymère d'une importance croissante pour l'industrie et qui a des impacts significatifs sur la recherche et le développement dans des domaines aussi variés que la chimie, la biologie, la santé ou encore la protection de l'environnement. Ses propriétés exceptionnelles expliquent l'engouement pour cette macromolécule naturelle, extraite de carapaces de crustacés, considérée il y a encore peu comme des déchets. Il s'est avéré que ce coproduit d'origine marine, très bon marché, peut participer à l'élaboration de nombreux produits commerciaux à haute valeur ajoutée. Pratiquement, tous les domaines d'applications industrielles, de la pharmacie à l'agroalimentaire, en passant par l'environnement, l'agriculture, le textile, la papeterie et les cosmétiques, sont concernés. Parmi ces domaines, la diététique et le biomédical sont en plein essor [48].

5.1. Domaine agroalimentaire

Dans les industries alimentaires, l'utilisation du chitosane n'est pas encore généralisée, à l'exception des pays asiatiques comme le Japon où de nombreux produits alimentaires enrichis en chitosane (nouilles, pâte de soja) sont trouvés. Aux Etats-Unis, le chitosane est utilisé comme ingrédient fonctionnel et comme film comestible pour protéger les aliments. En Europe, la réglementation sur l'utilisation du chitosane dans le domaine alimentaire est encore restrictive, il est utilisé comme un complément alimentaire. Les applications du chitosane dans le domaine agroalimentaire sont [53] :

- Additifs (liant, émulsifiant, stabilisant, épaississant, de conservation).
- Clarification, désacidification et détoxification on des boissons et des liquides alimentaires.
- Activité antibactérienne (préservation des aliments) enrobage alimentaire.
- Effet antioxydant (prévention de l'oxydation).
- Ingrédient fonctionnel (agent fixateur, capacité probiotique).
- Formation de films (emballage).

De nos jours, l'utilisation du chitosane comme un additif alimentaire la plus connue est « Fat blocker » : le chitosane inhibe la métabolisation des graisses grâce aux interactions entre ses fonctions amines et les groupements carboxyliques des lipides [54]. De plus, le chitosane est utilisée comme un agent de conservation de fruits ou de légumes [55]. Le chitosane est également utilisé comme agent antimicrobien pour éviter la détérioration des aliments et la prolifération bactérienne, et pour éviter la mélanose des crustacés et des mollusques [56]. Dans l'industrie des boissons, grâce aux propriétés coagulantes du chitosane, il sert à clarifier les jus de fruits ou à diminuer les composés phénoliques dans les vins [57]. Le chitosane est également utilisé pour désacidifier des boissons comme les bières, les jus de fruits et les vins [58]. ou tout simplement pour purifier et clarifier des eaux et des liquides alimentaires [59]. Le chitosane peut être utilisé pour la stabilisation d'émulsions dans la préparation de sauces. Il augmente la viscosité, la stabilité à l'écémage, tout en diminuant la taille des gouttelettes formées lors de l'émulsion [60]. Le chitosane peut être utilisé comme gélifiant dans des produits restructurés de viande et de poisson [61]. Enfin, ce biopolymère est une alternative aux emballages d'origine pétrochimique (polymères plastiques) en raison notamment de ses propriétés filmogènes [57]. Les emballages à base de chitosane sont appelés « emballages verts ». Même si, ces emballages verts ont un certain nombre d'avantages comme la « comestibilité », (non-toxique, non métabolisé, pas de goût et pas d'odeur), ils ont quelques inconvénients tels que l'adsorption d'eau (gonflement) et des propriétés plastiques insuffisantes. Pour ces raisons, plusieurs études se sont intéressées à la modification du chitosane par voie chimique ou enzymatique [62, 63].

5.2. Domaine biomédical et pharmaceutique

Les nombreuses propriétés biologiques du chitosane (biocompatibilité, bioactivité...) en font un candidat de choix pour les applications pharmaceutiques, biomédicales et cliniques (**Tableau 1.1**) : agent antimicrobien, hémostatique, pansement cicatrisant... Il est également utilisé comme système de libération contrôlée d'agents thérapeutiques par voie orale, transdermique, oculaire et nasale [64]. Il présente en effet de bonnes propriétés muco-adhésives et une absence de toxicité qui le prédisposent à des utilisations en thérapie génique et pour la vaccination. Le chitosane possède un caractère hémostatique ainsi que des propriétés cicatrisantes remarquables [65].

Le chitosane est un agent important en médecine classique, notamment comme « véhicule » de médicaments et d'autres substances thérapeutiques, et en médecine régénérative

(chirurgie reconstructrice par exemple) [66]. Il faut noter que le chitosane utilisé dans ces domaines est ultra pur et présente par conséquent un coût très élevé.

Des études récentes tendent à montrer que le chitosane exerce un effet bénéfique sur le renforcement du système immunitaire, le contrôle du niveau de cholestérol et de sucre dans le sang, et prévient le phénomène de vieillissement [2]. Dans de nombreuses applications, le chitosane est utilisé sous forme d'hydrogels chargés pour immobiliser des médicaments, des enzymes ou encore des substances thérapeutiques comme les vaccins, les antigènes ou gènes [67].

Tableau 1.1 : Applications du chitosane dans les domaines biomédical et pharmaceutique[53].

Champs d'application	Applications
Médecine	Accélération de la cicatrisation et de la guérison des blessures.
Chirurgie plastique	Stimulation de la régénération des tissus (prolifération des cellules).
Biologie cellulaire	Agent hémostatique, agent anti-infectieux, agent anti-tumeur, encapsulation de cellules et de facteur de croissance...
Pharmacie	Relargage de médicaments.
Ophtalmologie	Crème de soin, lentilles de contacts.
Alicaments	Complément alimentaire (produits amaigrissants).
Dentisterie	Gel dentaire.
Chirurgie	Dentaire implants dentaires.

5.3. Domaine cosmétique

Dans l'industrie des cosmétiques, les évolutions des réglementations françaises et européenne vis-à-vis de la santé publique et de l'environnement et la pression des consommateurs ont entraîné l'intégration de substances d'origine naturelle à la fois au niveau des produits, des formulations et des procédés. Ces tendances ont poussé au développement des recherches sur les macromolécules renouvelables, d'origine végétale ou marine, dont les polysaccharides. L'industrie cosmétique s'est également intéressée au chitosane car il présente diverses fonctions jouant ainsi plusieurs rôles lui permettant d'être utilisés dans des formulations cosmétiques contemporaines [53] :

- Rétention (humidité), agent hydratant (humidifiant).
- Agent anti-électrostatique (propriétés de gainage).
- Agent antiallergique.
- Agent épaississant (gélifiant), agent stabilisant (émulsion), agent de liaison.
- Agent fongicide et bactéricide (propriétés antimicrobienne).
- Relargage d'ingrédients, surfactant.
- Crèmes de soins, hydratantes, cicatrisantes, anti-âge (crèmes antirides).
- Filtres solaires.

En effet, le chitosane peut être utilisé à la fois comme agent hydratant, mouillant, tensioactif, épaississant, microencapsulant et/ou antimicrobien dans une même formulation cosmétique.

Compte tenu de la structure chimique du chitosane, il présente l'avantage, contrairement à la majorité des produits classiques, de posséder un caractère polycationique. De ce fait, les molécules chargées négativement peuvent interagir avec la macromolécule de chitosane. C'est le cas des protéines de la peau, des lipides, des tensioactifs, des détergents et des graisses du cheveu [1].

De plus, comme la plupart des polysaccharides, le chitosane, en raison de la liaison glycosidique, est un polymère semi-rigide et donc un bon épaississant. En particulier, la possibilité de formation de ponts hydrogène inter-macromoléculaires augmente encore ses performances allant jusqu'à un comportement de type gel physique [68].

Le caractère cationique et l'aptitude à former un film sur les cheveux expliquent ainsi son incorporation à de nombreuses préparations (shampoings, gel, fixant. Lotions et produits de rinçage). De plus, l'adhérence au revêtement cutané du chitosane serait supérieure à l'acide

hyaluronique. Le chitosane **i)** se fixe sur les cheveux par un mécanisme électrostatique, **ii)** forme un film élastique protecteur à la surface du cheveu, **iii)** donne à la chevelure de la souplesse tout en augmentant ses propriétés mécaniques, **iv)** permet le maintien de l'humidité des cheveux à une faible valeur et **v)** et assure le maintien de la coiffure à forte humidité [2].

5.4. Domaine agricole

Le chitosane peut également trouver des applications dans le domaine agricole. Les matériaux encapsulés à base de chitosane se retrouvent également dans des produits agricoles [2, 69].

- Enrobage de semences (encapsulation).
- Immobilisation cellulaire (horticulture).
- Fongicide (bio-pesticide).
- Fertilisant.
- Protection des cultures.
- Traitement des sols.
- Alimentation animale et vaccination animale.
- Contrôle des métaux essentiels à la croissance des plantes.

La présence de chitosane comme fertilisant accélère la croissance des plantes et améliore le rendement des cultures [2]. Le chitosane pourrait devenir l'engrais naturel et le pesticide du futur en tant que « bio-pesticide ». En effet, l'enrobage de semences des céréales avec le chitosane leur permettent de résister aux attaques de champignons et de bactéries pathogènes [56]. De plus, le chitosane permet de conserver les aliments pour bétail et protège les animaux contre des problèmes bactériologiques ou viraux. Il permet également de lutter contre les infections respiratoires qui affectent les troupeaux bovins. Il peut être aussi appliqué sous forme de spray oculaire [56].

5.5. Traitement des eaux

Les propriétés polyélectrolytes, chélatantes et complexantes du chitosane en font un bon candidat pour des applications environnementales dans le domaine du traitement des eaux usées [70](**Tableau 1.2**).

Tableau 1.2: Applications du chitosane dans le domaine de l'environnement [70].

Champs d'application	Applications
Traitement de l'eau potable	Ingénierie de l'eau (coagulation /floculation, filtration, adsorption).
Traitement des eaux usées	Agent coagulant.
Traitement des eaux de piscines	Chélatant de cations.
Chélation de métaux lourds	Réduction des métaux toxiques et radio-isotopes.
Récupération de métaux précieux	Récupération de métaux réutilisables.
Décoloration des eaux	Enlèvement du fer et du manganèse des piscines.
Filtration membranaire	Agent décolorant.
Traitement des boues	Agent déshydratation des boues.

Ces applications sont basées sur le caractère polycationique du chitosane en milieu acide et sur sa solubilité qui ouvre la porte à de nombreuses applications dans le domaine de la coagulation-floculation, de la chélation, de l'adsorption ou de l'ultrafiltration. En effet, ses groupements amines protonés en milieu acide sont capables de fixer tous les métaux de transition et les radionucléides [71, 72].

Le chitosane peut être utilisé comme agent coagulant, chélatant ou adsorbant pour complexer une large gamme de polluants comme les molécules aromatiques et phénoliques, les colorants et organiques (effluents agroalimentaires, papetiers et textiles) [53]. Une autre application récente consiste à immobiliser des microorganismes ou des boues dans des matrices polymères à base de chitosane pour traiter les eaux usées, toujours sur le même principe de l'encapsulation [73].

5.6. Autres domaines d'applications

Le chitosane a trouvé des applications dans d'autres domaines. En chimie, il est utilisé en tant que super-absorbants [74], phases stationnaires pour la chromatographie [75] et l'osmose inverse [76] ou encore supports pour la catalyse [77] (**Tableau 1.3**).

Tableau 1.3 : autres domaines d'applications du chitosane [53]

Champs d'application	Application
Chimie	Capteurs chimiques, films biodégradable (emballage), super absorbants.
Biotechnologie	Immobilisation des cellules et des enzymes, matrice pour culture et régénération cellulaire, membranes.
Papeterie	Rétention d'eau (filières papetière et textile).
Textile	Additifs pour pâtes à papiers, agent antibactérien.
Œnologie	Clarification, désacidification et stabilisation des vins.
Photographie	Films photographiques, extraction de l'argent.

Le chitosane est utilisé dans les nouvelles formulations de peintures non toxiques pour protéger la coque des bateaux [2]. Le pouvoir cationique du chitosane est utilisé dans l'industrie papetière pour produire des papiers possédant une surface plus lisse et résistante mieux à l'humidité [76], ce qui est très apprécié dans le domaine de la photographie.

1. DEFINITION DES PLANS D'EXPERIENCES

Un plan d'expérience constitue une stratégie de planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manières efficaces et économique. La méthodologie des plans d'expériences est basée sur le fait qu'une expérience convenablement organisée, conduira fréquemment à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats. (Norme ISO 3535-3) [78].

2. L'INTERET DES PLANS D'EXPERIENCES

L'intérêt majeur des plans d'expérience réside dans le fait qu'ils permettent d'optimiser le nombre d'expérimentations à réaliser lors de la phase d'essais, en déterminant au préalable les réels facteurs ou combinaisons de facteurs influents sur la réponse du système à étudier [78].

3. GENERALITES SUR LES PLANS D'EXPERIENCES

Ces plans d'expériences ont un vocabulaire et une terminologie qu'il est nécessaire de définir :

3.1. Réponse

On qualifie de réponse la grandeur qui est observée pour chaque expérience réalisée. En d'autres termes, c'est le résultat mesuré d'une étude. Sachant qu'à chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. L'ensemble de ces dernières, forme la surface de réponse. La valeur d'une réponse ne peut être modifiée que de manière indirecte en faisant varier les facteurs [79].

3.2. Facteur

Un facteur peut être toute variable obligatoirement contrôlable, pouvant influencer sur la réponse observée. La différence fondamentale entre la notion de variable et celle de facteur tient donc dans le fait que tout facteur doit pouvoir être modifié sans difficulté. La valeur donnée à un facteur pour réaliser une expérience est appelée niveau. Les facteurs peuvent être : Quantitatifs, Qualitatifs, Contrôlables, Incontrôlables, Continus et discontinus [80].

3.3. Domaine expérimental

Il présente l'espace dans lequel peuvent varier les facteurs. Les informations tirées des résultats expérimentaux ne seront valables que dans ce domaine.

3.4. Variables centrées réduites

Soit A, la variable naturelle ou réelle dont le niveau bas correspond à la variable normée -1 et le niveau A+ à +1. La valeur centrale ou milieu du domaine est :

$$A_0 = \frac{A^+ + A^-}{2}$$

On introduit également la notion du pas :

$$\text{Pas} = \frac{A^+ - A^-}{2}$$

Le passage des variables d'origines A aux variables codées notées X est donnée par :

$$X = \frac{A - A_0}{\text{Pas}}$$

3.5. Matrice d'expérience

Une matrice d'expérience est un objet mathématique qui représente l'ensemble des expériences à réaliser. Elle est toujours écrite sous forme codée. Elle est constituée de N lignes correspondants au nombre d'expériences et K colonnes correspondantes au nombre de variables. Dans une matrice donnée un élément X_{ij} correspond au niveau de la ième et de la jème variable.

3.6. Plan d'expérimentation

Un plan d'expérimentation correspond à la « traduction » de la matrice d'expérience en une matrice directement utilisable par l'expérimentateur, car les variables seront exprimées en variables naturelles. Le plan d'expérimentation doit faire l'objet d'une analyse minutieuse pour voir si toutes les expériences sont réalisables et si elles ne présentent aucun risque [80].

3.7. Méthodologie expérimentale

La démarche à respecter est la suivante :

- Définition de l'objectif.
- Choix des réponses expérimentales.
- Choix des facteurs et du domaine expérimental d'intérêt.
- Etablir la stratégie expérimentale.

- Construction de la matrice d'expériences.
- Construction du plan d'expérimentation.
- Expérimentation.
- Calcul des estimations des informations recherchées.
- Interprétation des résultats.

4. STRATEGIE DE LA METHODOLOGIE DE LA RECHERCHE EXPERIMENTALE

Selon l'objectif tracé, le choix de la stratégie adaptée doit comporter quelques informations qui sont censés répondre à l'objectif, on peut distinguer quatre types :

4.1. Recherche exploratoire

Il s'agit du cas où nous ne connaissons presque rien sur le domaine. La MRE offre des techniques permettant de cadrer la démarche pour éviter de travailler de façon anarchique.

4.2. Criblage de facteurs (screening)

Les plans de criblage dont l'objectif est de repérer les facteurs les plus influents sur une réponse donnée avec un minimum d'essais [80].

4.3. Etude quantitative des facteurs

Contrairement à la stratégie classique qui consiste à faire varier un facteur à la fois tout en gardant les autres constants et où le nombre d'essais est élevé, la méthodologie de la recherche expérimentale permet d'avoir les informations désirées avec un minimum d'essais. Elle fait aussi apparaître les interactions entre les facteurs qui sont complètement ignorées dans la stratégie classique [80].

4.4. Etude quantitative des réponses

Appelée aussi optimisation, cette stratégie correspond à la modélisation du phénomène sous la forme d'une relation empirique qui permet de déterminer la valeur de la réponse en tout point du domaine expérimental sans qu'on soit obligé de faire l'expérience. Ainsi, l'expérimentateur peut accéder à la zone la plus intéressante du domaine [80].

5. CRIBLAGE DE FACTEURS

Les matrices de Hadamard sont les matrices les plus utilisées pour le criblage des facteurs. Dans ces matrices, les niveaux des facteurs ne prennent généralement que deux niveaux distincts notés -1 et +1 en variables codées. Elles permettent d'estimer le "poids" de chaque facteur. La variance de l'estimation de chaque facteur est donnée par la relation :

$$\text{Var}(b_j) = \sigma^2/N.$$

Où σ^2 est la variance des réponses, N le nombre d'expériences à réaliser et b_j l'estimation du poids du facteur j.

Pour K facteurs à deux niveaux, le nombre d'expériences N qui est toujours un multiple de 4 doit satisfaire la condition : $N \geq K+1$.

6. ETUDE QUANTITATIVE DES FACTEURS

Contrairement au criblage, dans l'étude quantitative, on ne parlera plus du poids d'un facteur mais de son effet car les facteurs ne sont pas indépendants.

6.1. Matrice factorielle complète 2^K

Dans ces plans, les facteurs ne peuvent prendre que deux niveaux distincts notés -1 et +1 en variable codées. Le nombre d'expériences à réaliser est $N = 2^K$.

Toutes les colonnes commencent par -1, on alterne les -1 et +1 toutes 2 j-1ème lignes pour la jème colonnes. On ajoutera ensuite une colonne ou plusieurs colonnes pour reporter les résultats expérimentaux (réponse notée Y_i) [80].

Les plans 2^k sont simples à concevoir et riches en informations : ils permettent de décrire quantitativement tous les effets des facteurs et de toutes les interactions, le seul inconvénient est dès que le nombre de facteurs augmente, leur mise en oeuvre devient lourde couteuse, car le nombre des essais devient vite très important [80].

6.2. Matrice factorielle fractionnaire 2^{K-p}

Le but des plans fractionnaires consiste à réduire le nombre d'expériences à réaliser par rapport au nombre maximum donné par le plan complet.

On parlera de plan 2^{K-p} (p entier) pour indiquer un plan fractionnaire issu du plan Complet 2^K avec K facteurs à 2 niveaux. Par exemple le plan 2^{6-2} est un plan fractionnaire permettant

l'étude de 4 facteurs en utilisant la matrice des effets du plan complet 2^4 . 2^4 expériences à réaliser au lieu de 2^6 expériences du plan complet. Le nombre d'expériences est divisé par 4, il correspond à la réalisation d'un quart de plan complet 2^6 [80] Donc, les plans factoriels fractionnaires sont des plans qui permettent d'étudier tous les facteurs mais dont le nombre d'essais est réduit par rapport aux plans factoriels complets.

7. LES CATEGORIES DES PLANS D'EXPERIENCES

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

7.1. Les plans réduits

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

7.2. Les plans complets

C'est une catégorie de plans qui fournit une information la plus complète possible sur des systèmes présentant relativement peu de facteurs. Elle consiste à tester toutes les combinaisons possibles, autrement dit, toutes les combinaisons de toutes les modalités des différents facteurs sont examinées [81].

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

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

La méthode peut s'adapter au cas où les facteurs ont plus de deux niveaux. Dans le cadre d'un modèle affine, ce plan permet d'identifier l'influence de tous les facteurs et de toutes les

interactions, jusqu'à l'ordre maximal. Parmi les plans complets, on trouve la méthode des surfaces de réponses.

7.2.1. La Méthode des surfaces de réponses

7.2.1.1. Définition

La méthode des surfaces de réponses consiste en un ensemble de techniques mathématiques et statistiques utiles pour modéliser et analyser des problèmes où une réponse est affectée par différents facteurs [82]. C'est une étude quantitative, l'objectif étant d'optimiser la réponse. Le plan de second degré ou de surface de réponse permet d'établir des modèles mathématiques de second degré. Il est utilisé pour les variables continues [80].

7.2.1.2. Les Modèles de surface de réponse

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

- Plans de type « poupées russes ».

Ce model se réalise par les étapes suivantes :

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

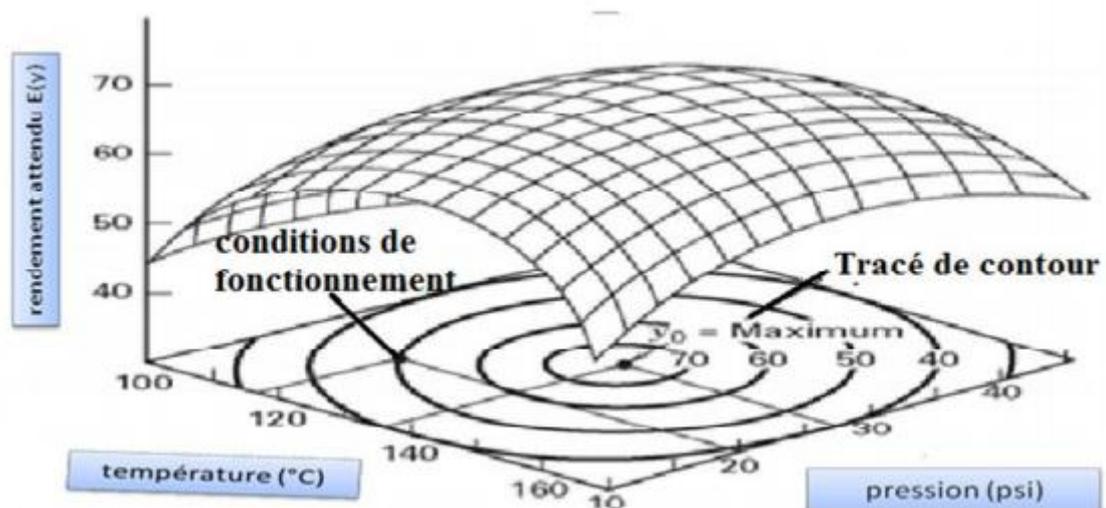


Figure 2.1: Plan de type poupées russes [82].

➤ Expérimentation séquentielle :

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

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

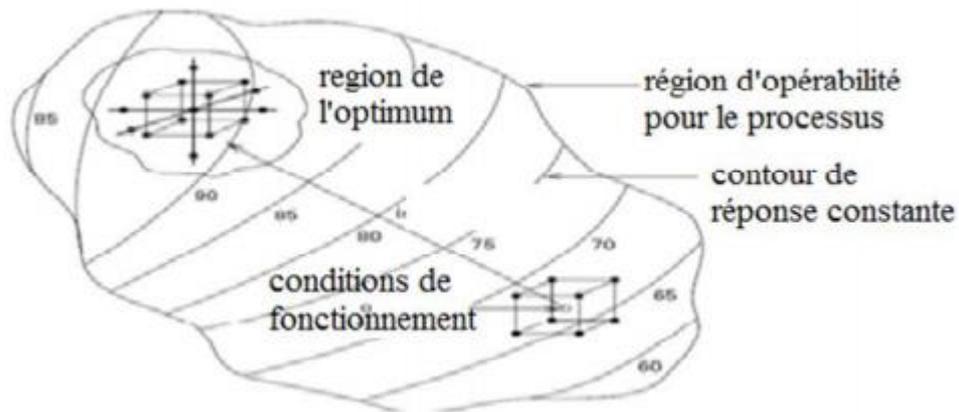


Figure 2.2 : Expérimentation séquentielles [82].

7.2.1.3. Représentation graphique

La représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse nécessite un espace ayant une dimension de plus que l'espace expérimental. Un plan à deux facteurs utilise un espace à trois dimensions pour être représenté : une dimension pour la réponse (axe vertical), deux dimensions pour les facteurs (axes horizontaux). À chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. À l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse. L'interprétation graphique de l'équation de surface de réponse est très utile dans la recherche de l'optimum, il s'agit de déterminer les valeurs (x_1, \dots, x_n) de m facteurs quantitatives qui optimise la réponse y [80].

Notre travail expérimental a été réalisé au niveau du laboratoire d'analyses fonctionnelle des procédés chimiques de la faculté des Technologie.

Les analyses de spectroscopie infrarouge de tous les échantillons de la matrice expérimentale ont été réalisées au niveau du laboratoire méthode physique d'analyses du Département Génie des procédés de l'université SAAD DAHLEB Blida.

Dans le cadre de ce travail, nous avons procédé à l'extraction de la chitine à partir des plumes de calamar. Cette même chitine a servi à la préparation du chitosane ; l'objectif de ce travail étant d'optimiser la préparation du chitosane à partir de la chitine. Pour ce faire, la désacétylation de la chitine a été effectuée par un traitement alcalin (NaOH). L'optimisation a pu être réalisée par le biais de la méthode des surfaces de réponses, qui est un plan d'expériences utilisant une matrice offrant un ensemble de conditions opératoires (température, temps et concentration en NaOH) à appliquer, afin d'étudier le phénomène de désacétylation de la chitine et de pouvoir l'optimiser.

1. MATERIELS ET METHODES EXPERIMENTALES

Dans ce travail nous avons procédé d'abord à l'extraction de la chitine à partir des plumes de calamar et des sépions en suivant trois étapes principales : élimination des protéines, élimination des sels minéraux. Par la suite nous sommes passés à la désacétylation de la chitine par un traitement alcalin pour obtenir le chitosane.

1.1. Matériels

Les plumes de calamar obtenu à partir des poissonniers d'Alger (**Figure 3.1**), sont utilisées pour la préparation du chitosane en poudre.



Figure 3.1 : Photographie des plumes de calamar.

2. EXTRACTION DU CHITOSANE

2.1. Le prétraitement

On commence le prétraitement par le lavage. Les plume de calamar obtenues sont bouillies dans de l'eau pendant une heure, broyées et séchées à 160 °C. Après lavage, Ils sont séchés à l'air libre pendant 24heure. Une fois le séchage terminé, ils sont une deuxième fois dans une étuve à une température de 80°C puis ensuite broyées (**Figure 3.2**).



Figure 3.2 : Les plumes de calamar après broyage.

2.2. La déminéralisation

Les plume de calamar, après prétraitées (lavage, séchage et broyage), ont été minutieusement mélangées avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 0.55M ; le rapport solide-liquide étant de 1/10 (g/ml). La réaction est effectuée à une température ambiante sous agitation continue pendant 30 minutes. La poudre des plumes de calamar et les sépions, ainsi déminéralisée, est rincée avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre le pH 7,0. Cette poudre est ensuite séchée à l'étuve [83].

2.3. La déprotéinisation

Après la déminéralisation la poudre obtenue des plumes de calamar séchées est placée dans une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) durant 24h et à 80°C avec un ratio de solvant à solide (w/v) de 1/10 g/ml.

Ceci est fait afin de retirer les protéines ainsi que d'autres matières organiques. Après cette opération, La poudre de carapace, ainsi déprotéinée, est rincée avec de l'eau du distillée jusqu'à atteindre le pH 7,0 [83]. Cette poudre est ensuite séchée à l'étuve (**Figure 3.3**).



Figure 3.3 : La chitine des plumes du calamar.

2.4. La désacétylation

La désacétylation est une réaction qui doit être réalisée dans des conditions bien plus dures que la déprotéinisation. Les acides comme les bases peuvent réduire la longueur de chaînes du polymère, cependant ce sont les milieux basiques qui sont utilisés car moins susceptibles d'hydrolyser la chitine. Il est intéressant de noter qu'à forte concentration en base, la réaction de N-désacétylation a tendance à se faire préférentiellement par rapport à la réaction d'hydrolyse des chaînes [84, 85].

3. OPTIMISATION DE LA DZSACETYLATION CHIMIQUE DE LA CHITINE

L'optimisation de la désacétylation chimique de la chitine a été effectuée par la méthode des surfaces de réponses. Pour ce faire, la matrice indiquée dans le **tableau 3.1** a permis d'effectuer 17 expériences de désacétylation ; pour chaque expérience, 1g de chitine sont mélangés à 100 ml de NaOH. Les expériences ont été réalisées sous agitation continue. Les résidus obtenus ont été filtrés, rincés avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre le pH 7,0,. Ces résidus sont séchés à l'étuve à 100°C et pesés après chaque opération de séchage.

Tableau 3.1 : Matrice de surfaces de réponses utilisée pour la désacétylation de la chitine.

Expériences	Concentration NaOH (M)	Temps d'incubation (Heure)	Température d'incubation (°C)
1	40	2	80
2	80	2	80
3	40	6	80
4	80	6	80
5	40	2	120
6	80	2	120
7	40	6	120
8	80	6	120
9	40	4	100
10	80	4	100
11	60	2	100
12	60	6	100
13	60	4	80
14	60	4	120
15	60	4	100
16	60	4	100
17	60	4	100



Figure 3.4 : β -chitosane extrait à partir des plumes du calamar obtenue par la méthode de surfaces de réponses.

4. CARACTERISATION DES PRODUITS OBTENUS

4.1. Test de solubilité

L'une des caractéristiques du chitosane par rapport à la chitine est sa solubilisation en milieu acide dilué, l'acide le plus fréquemment utilisé est l'acide acétique [68]. En général, le chitosane est parfaitement soluble à pH 3-4 mais également soluble dans des solutions diluées (0,1-1%) d'acide nitrique et d'acide chlorhydrique. En effet, les groupements aminés (NH_2) du chitosane sont protonés à partir du pH 3-4 et le polymère chargé positivement (NH_3^+) devient soluble. Grâce à cette propriété, il est possible de confirmer que les produits préparés sont des chitosane [4]. Dans cette étude, 50 mg de chaque échantillon ont été solubilisés dans 50 ml d'acide acétique à 1%.

4.2. Détermination du degré de désacétylation

Le degré désacétylation a une influence sur toutes les propriétés physicochimiques (viscosité, solubilité, etc....) du chitosane et peut être décisif quant aux applications dans lesquelles il est utilisé. Plusieurs techniques permettent de caractériser le DDA% du chitosane, cependant les spectroscopies RMN et IR semblent les plus appropriées pour des caractérisations rapides et peu coûteuses.

4.3. Analyse par spectroscopie Infrarouge IR

La spectroscopie IR constitue une méthode de choix pour le suivi de la conversion de la chitine en chitosane. Nous pouvons ainsi mettre en évidence l'apparition ou la disparition de certaines bandes de façon très significative au cours de ces étapes de synthèse [86].

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR dans la plage de 400 - 4000 cm^{-1} .

Méthode

Dans la présente étude, le spectre infrarouge a été obtenu à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR -8900 associé à un logiciel IRSolution.

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

La détermination du degré de désacétylation (DDA%) s'effectue par l'analyse du spectre (FTIR) en utilisant la formule [87]:

$$\text{DDA}\% = 100 - [(A_{1655\text{cm}^{-1}}/A_{3450\text{cm}^{-1}}) * 100/1.33] \quad \text{Eq.3.1}$$

Avec :

$A_{1655} \text{ cm}^{-1}$ Absorbance à 1660 cm^{-1} de la bande d'amide primaire (Amide I).

$A_{3450} \text{ cm}^{-1}$ Absorbance à 3450 cm^{-1} de la bande hydroxyle.

Le facteur 1.33 représente ($A_{1655} \text{ cm}^{-1} / A_{3450} \text{ cm}^{-1}$) pour une chitine entièrement N-acétylée.

4.4. Détermination du poids moléculaire

Le poids moléculaire des échantillons préparés est calculé à partir de sa viscosité intrinsèque notée $[\eta]$ en appliquant la relation suivante [36]:

$$[\eta] = K \times P M_v^a \quad \text{Eq.3.2}$$

$[\eta]$: viscosité intrinsèque (dl.g^{-1}).

$P M_v$: poids moléculaire moyen viscosimétrique du polymère (KDa).

K et a : paramètres qui dépendent du système polymère-solvant à une température donnée. Dans notre étude, on a utilisé le solvant acide acétique ; $T=30^\circ\text{C}$; $a=0,72$; $K=4,74 \times 10^{-5}$ (g.dl^{-1}).

On détermine $[\eta]$ en calculant : En premier, la viscosité relative par la mesure du temps d'écoulement de la solution d'échantillon et celle du solvant. Ainsi, elle s'écrit :

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_0} \quad \text{Eq.3.3}$$

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

t_0 : temps d'écoulement du solvant.

La mesure du temps a été effectuée en suivant les étapes expérimentales suivantes :

Dissoudre 1 g d'échantillon dans 100 ml d'une solution d'acide acétique à 1% (solution mère). A partir de la solution mère, préparer 05 solutions diluées de chitosane dans de l'acide acétique (1%) à des teneur suivantes (g.dl^{-1}) : $C_1= 0,1$; $C_2= 0,08$; $C_3= 0,06$; $C_4=0,04$; $C_5= 0,02$. Verser le contenu de chaque solution dans le viscosimètre ;

Mesurer le temps d'écoulement du solvant (CH_3COOH) et de chacune des solutions. En second, la division du logarithme de cette valeur par la concentration de la solution de chitosane (g.dl^{-1}), on obtient ce que nous appelons la viscosité inhérente :

$$\eta_{inh} = \frac{\ln \eta_{rel}}{C_i} \quad \text{Eq.4}$$

Ainsi, pour différentes concentrations de chitosane, on obtient donc différentes valeurs de viscosités inhérentes. Le tracé des viscosités inhérentes en fonction des concentrations donne lieu à une droite dont l'ordonnée à l'origine est égale à la viscosité intrinsèque.

5. DETERMINATION DES PARAMETRES OPTIMAUX DE LA DESACETYLATION DE LA CHITINE

5.1. Application de la méthode des surfaces de réponses

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

Le plan d'expérience de type surfaces de réponse est un plan complet qui consiste à déterminer les combinaisons optimales des facteurs d'entrée qui permettent d'optimiser la variable de sortie en un nombre d'expériences minimal. Dans la présente étude, la variable de sortie à optimiser est le DDA et le poids moléculaire.

Cette partie du chapitre est consacrée à la présentation des résultats expérimentaux obtenus dans cette étude, ainsi qu'aux interprétations et discussion portant sur ces résultats.

1. CARACTERISATION DES PRODUITS OBTENUS

1.1. Test de solubilité

Les échantillons obtenus ont été mis dans une solution d'acide acétique afin de tester leur solubilité en milieu acide dilué. Cette propriété est primordiale pour l'application ultérieure. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le (**tableau 4.1**).

L'insolubilité peut être expliquée par la présence d'impuretés dans les échantillons produits.

Tableau 4.1 : Test de solubilité des plumes de calamar désacétylées.

Expérience	Solubilité dans AA 1%
1	Soluble
2	Soluble
3	Soluble
4	Soluble
5	Soluble
6	Soluble
7	Soluble
8	Soluble
9	Soluble
10	Soluble
11	Soluble
12	Soluble
13	Soluble
14	Soluble
15	Soluble
16	Soluble
17	Soluble

1.2. Caractérisation par FTIR

La spectroscopie FTIR nous renseigne sur les différents groupements chimiques présents dans la structure du polysaccharide.

Les spectres infrarouges obtenus à partir des échantillons de chitine désacétylée sont présentés par la (**figure 4.1**) et l'annexe A. L'exploitation des différentes bandes obtenues a démontré l'existence de bandes d'absorption représentant les groupements fonctionnels caractéristiques du chitosane, il s'agit de :

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

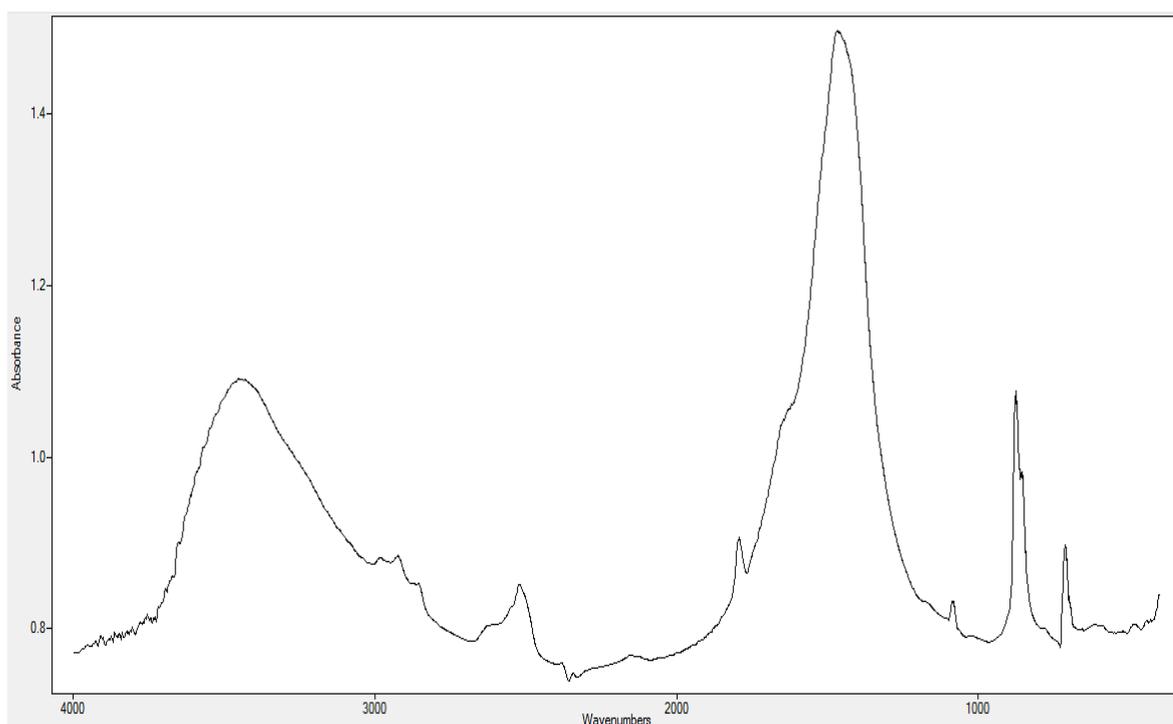


Figure 4.1 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°1.

La majorité des spectres du chitosane présente une similarité dans les plages d'absorption avec une différence dans l'intensité d'absorption.

1.3. Détermination de DDA des chitosanes

Le calcul de DDA a été fait, par FTIR, pour tous les échantillons préparés. Les résultats du DDA obtenus sont présentés dans le (**Tableau 4.2**).

Tableau 4.2 : Résultats obtenus après calcul des DDA.

Expérience	DDA
1	89,7%
2	86,77%
3	87,12%
4	87,13%
5	92,43%
6	97,14%
7	82,79%
8	94,91%
9	91,38%
10	96,26%
11	96,81%
12	92,97%
13	88,42%
14	96,71%
15	85,65%
16	85,58%
17	85,89%

1.4. Détermination du poids moléculaire

Le poids moléculaire des échantillons préparés est calculé à partir de sa viscosité intrinsèque notée $[\eta]$. Les résultats du PM obtenus sont présentés dans le (**Tableau 4.3**).

Tableau 4.3 : Résultats obtenus après calcul des PM.

Expérience	PM (KDa)
1	57000
2	85000
3	80000
4	70000
5	44300
6	23000
7	98700
8	38700
9	46400
10	31200
11	27000
12	40000
13	59340
14	29600
15	92000
16	96390
17	89000

2. ANALYSE DES RESULTATS PAR LA METHODE DE SURFACES DE REPONSES

2.1. Réponse obtenue (DDA %)

Les résultats obtenus (**Tableau 4.2**) montrent clairement l'existence d'une variation des DDA en fonction des expériences réalisées suggérant une influence des conditions de désacétylation (facteurs) sur la variation des DDA. Les valeurs de DDA obtenues sont supérieures à 80%. Ces valeurs sont similaires à celle trouvée par Singh, Benjakul [88]. Nous sommes donc certains que les produits sont du chitosane.

2.2. Interprétation des représentations graphiques obtenues par la méthode de surfaces de réponses

Le tracé obtenu par la méthode de surfaces de réponses est un graphique qui représente l'interaction entre les variables. Chaque tracé représente la variation de la réponse en fonction de la combinaison, des facteurs, pris deux à deux, tandis que l'autre variable sera maintenue au niveau zéro. Il permet, ainsi, de localiser le niveau optimal de chaque variable [89].

2.2.1. Variation du DDA en fonction de la concentration en NaOH et du temps d'incubation

La variation du DDA en fonction de la concentration en NaOH et du temps d'incubation est représentée par la (figure 4.2). Celle-ci montre que l'augmentation du DDA suit l'augmentation de la concentration en NaOH avec une diminution du temps d'incubation.

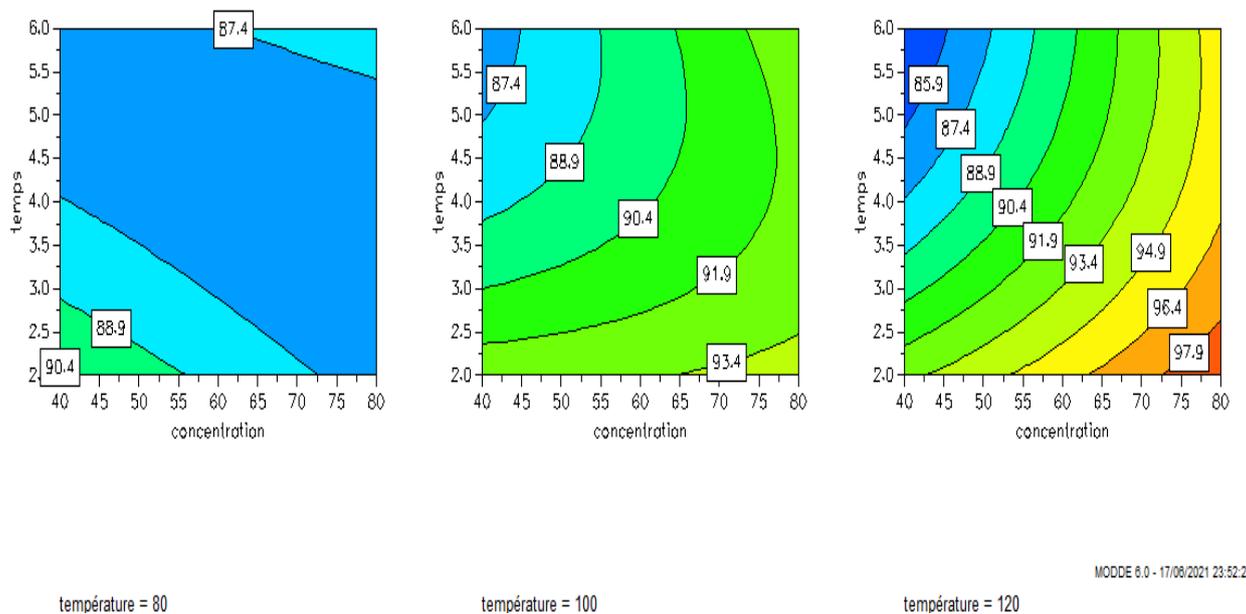


Figure 4.2 : Courbe de l'évolution du DDA en fonction de la concentration en NaOH et du temps d'incubation.

2.2.2. Variation du DDA en fonction de la concentration en NaOH et de la température d'incubation

La variation du DDA en fonction de la concentration en NaOH et de la température d'incubation est représentée par la (figure 4.3). Il est à relever qu'il y a interaction entre les paramètres concentration en NaOH et température. En effet, après un temps d'incubation de 4 heure lorsqu'il y a augmentation de ces deux paramètres, le DDA augmente. Par contre

après un temps d'incubation de 2 heure, la concentration ne semble pas avoir un effet sur le DDA.

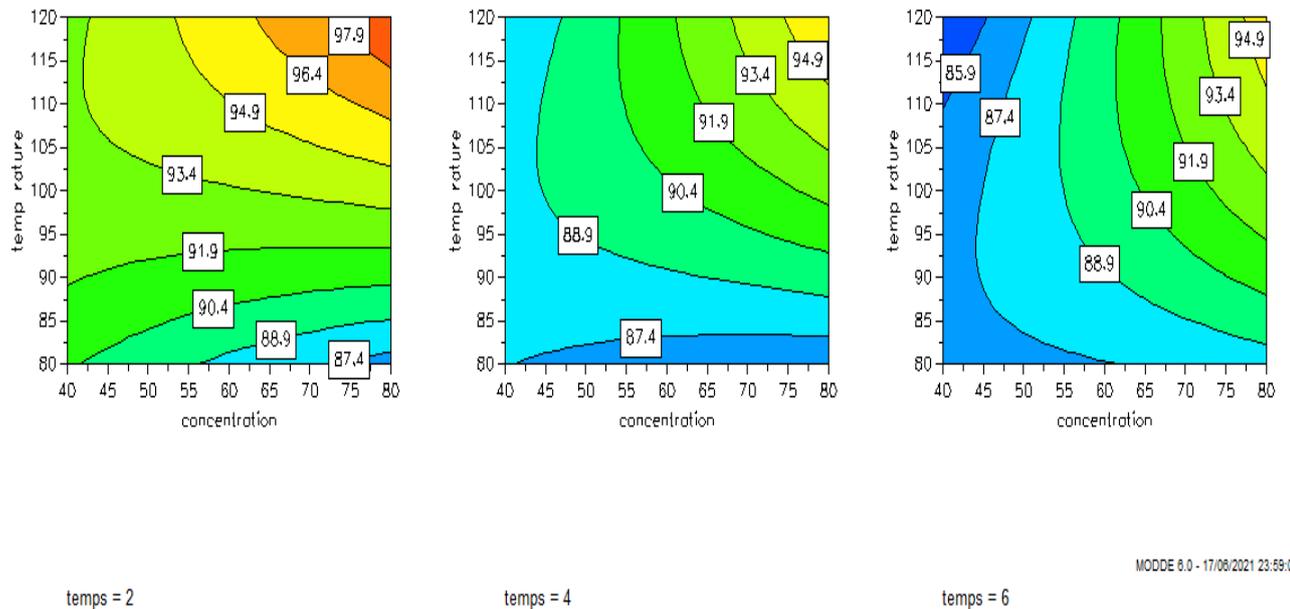


Figure 4.3 : Courbe de l'évolution du DDA en fonction de la concentration en NaOH et de la température d'incubation.

2.2.3. Variation du DDA en fonction du temps et de la température d'incubation

D'après la (**figure 4.4**), on remarque qu'il y a interaction entre le facteur température et le facteur temps. En effet, les plus hautes valeurs de DDA sont atteintes lorsque l'augmentation du facteur température est accompagnée par la diminution du facteur temps.

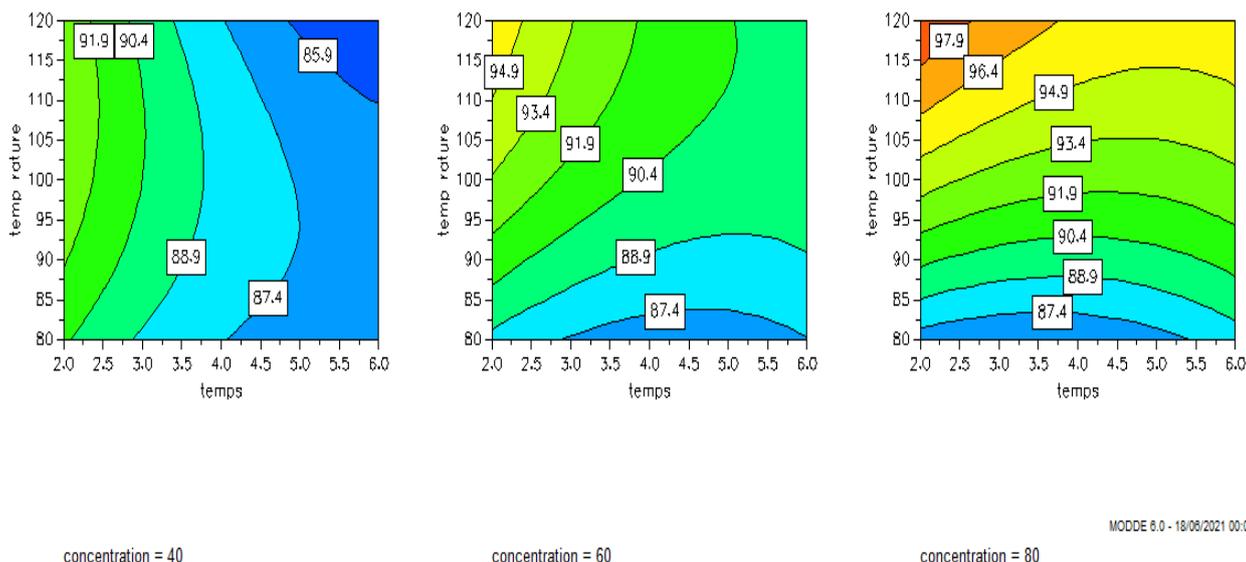


Figure 4.4: Courbe de l'évolution du DDA en fonction du temps et de la température d'incubation.

2.2.4. Variation du poids moléculaire en fonction du degré de désacétylation

La figure 4.5 montre clairement que le poids moléculaire diminue au fur et à mesure que le DDA augmente. Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs réalisés concluant que le poids moléculaire du chitosane peut diminuer au cours du processus de désacétylation.[3, 90, 91]. Mima, Miya [4] ont rapporté que le PM du chitosane était de 790 et 500 kDa après désacétylation à 60 et 110°C, ce qui est en accord avec nos résultats.

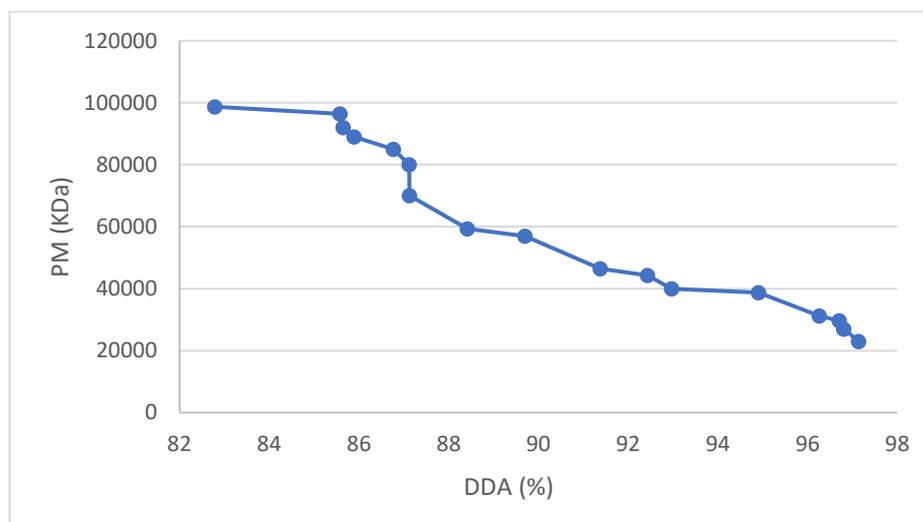


Figure 4.5 : Variation du poids moléculaire en fonction du DDA.

Les contours des figures (4.2 ; 4.3 et 4.4) présentent l'effet de différents paramètres et de leurs interactions. Les interactions entre la concentration de NaOH et la température montrée dans la (figure 4.3) révèlent une très significative influence de la température sur l'efficacité de la désacétylation de chitine. À la plus haute concentration de NaOH 80% ; le pourcentage de désacétylation augmente à partir de la température d'environ 105°C. Toutefois, l'augmentation de la concentration de NaOH > 60 % indique une augmentation de DDA%. D'autre part, la (figure 4.2) montre l'interaction entre la concentration en NaOH et le temps, les effets sont moins importants sur la réaction de désacétylation après un temps >4h avec des concentrations supérieures à 50%. L'interaction entre le temps et la température montrent que des valeurs moindres de cette dernière le temps à peu d'effet sur DDA%. Les hauts degrés de désacétylation (DDA%>80%) se trouvent à la concentration de NaOH supérieur à (>60%), au la plus haute température (>100°C) et temps réduit (<3 h). Ces résultats sont d'ailleurs en concordance avec des travaux similaire qui indiquent que le PM et le DDA du chitosane sont principalement affectés par la concentration de NaOH le temps de réaction, la température et la répétition des étapes alcalines. [3, 90-92].

Singh, Benjakul [88] ont rapporté l'influence de la concentration de NaOH, de la température et du rapport solution/chitine et ont trouvé que chitosane DDA augmente avec l'augmentation de la température et de la concentration de NaOH.

CONCLUSION

L'objectif de notre travail est d'optimiser la préparation d'un biopolymère aux innombrables propriétés, nommé chitosane. Pour y aboutir, nous avons eu recours à la méthode de surfaces de réponses, qui permet en un nombre limité d'expériences d'avoir un maximum d'information sur les effets et les interactions des paramètres étudiés. Dans la présente étude, le chitosane était préparé à partir de la chitine extraite des plumes de calamar. Pour ce faire, la chitine a été désacétylée suivant les conditions données par la matrice du plan d'expériences pour surfaces de réponses.

L'optimisation a porté sur trois conditions opératoires que sont la concentration initiale de NaOH, le temps et la température de réaction. Les résultats de l'optimisation ont permis d'obtenir un chitosane de DDA appréciable (97,14%), et ce, dans les conditions optimales suivantes : NaOH à 80% à 120°C pendant 2h. L'avantage d'utiliser des conditions douces est de permettre de réaliser une désacétylation tout en minimisant la baisse du poids moléculaire du polymère, due à la dépolymérisation qui a lieu en conditions de désacétylation drastiques.

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

- la caractérisation du produit obtenu ;
- l'étude des propriétés du produit ainsi obtenu ;
- l'essai de ce processus à l'échelle pilote ou semi-industrielle pour en déterminer la possibilité d'utilisation à l'échelle industrielle.

Références bibliographiques

1. Rinaudo, M., *Chitin and chitosan: Properties and applications*. Progress in polymer science, 2006. **31**(7): p. 603-632.
2. Kumar, M.N.R., *A review of chitin and chitosan applications*. Reactive and functional polymers, 2000. **46**(1): p. 1-27.
3. Tolaimate, A., et al., *On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin*. Polymer, 2000. **41**(7): p. 2463-2469.
4. Mima, S., et al., *Highly deacetylated chitosan and its properties*. Journal of applied polymer science, 1983. **28**(6): p. 1909-1917.
5. رمضان, et al., *Extraction et Optimisation de degré désacétylation du chitosane*. 2019.
6. Mokrani, N., *Préparation et étude du comportement de membranes biopolymères alginate de sodium/chitosane*, 2013, Université de Boumerdès-M'hamed Bougara.
7. Wallach, J., *Biochimie agro-industrielle: By G Linden and D Loriet. pp 368. Masson, Paris. 1994 (In French)*, 1995, Wiley Online Library.
8. Paul, W. and C. Sharma, *Chitosan, a drug carrier for the 21st century: a review*. STP pharma sciences, 2000. **10**(1): p. 5-22.
9. Einbu, A. and K.M. Vårum, *Depolymerization and de-N-acetylation of chitin oligomers in hydrochloric acid*. Biomacromolecules, 2007. **8**(1): p. 309-314.
10. Gooday, G.W., *The ecology of chitin degradation*. Advances in microbial ecology, 1990: p. 387-430.
11. Pillai, C.K., W. Paul, and C.P. Sharma, *Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation*. Progress in polymer science, 2009. **34**(7): p. 641-678.
12. Rinaudo, M., *Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials*. Polymer International, 2008. **57**(3): p. 397-430.
13. Rudall, K. and W. Kenchington, *The chitin system*. Biological Reviews, 1973. **48**(4): p. 597-633.
14. Rudall, K. *Chitin and its association with other molecules*. in *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia*. 1969. Wiley Online Library.
15. Atkins, E., *Conformations in polysaccharides and complex carbohydrates*. Journal of Biosciences, 1985. **8**(1-2): p. 375-387.
16. Vandamme, E.J., S. Baets, and A. Steinbüchel, *Biopolymers: Polysaccharides II, Polysaccharides from Eukaryotes* 2002: Wiley-Vch.
17. BOUDOUIA, N., *Modification, caractérisation et valorisation d'un matériau d'origine naturelle le chitosane pour la dépollution des eaux*, 2020.
18. Kurita, K., *Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans*. Marine biotechnology, 2006. **8**(3): p. 203-226.
19. Casu, B., *Structure and biological activity of heparin*. Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry, 1985. **43**: p. 51-134.
20. Sandford, P., *Commercial sources of chitin and chitosan and their utilization*. Advances in chitin science, 2003. **6**: p. 35-42.
21. Crini, G., et al. *Chitine et chitosane. Préparation, propriétés et principales applications*. in *Chitine et chitosane (du biopolymère à l'application)*. 2009.
22. Rinaudo, M., *Materials based on chitin and chitosan*, 2014, Wiley Online Library. p. 63-80.
23. Tolaimate, A., et al., *Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties*. Polymer, 2003. **44**(26): p. 7939-7952.
24. No, H.K., S.P. Meyers, and K.S. Lee, *Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1989. **37**(3): p. 575-579.

25. No, H.K. and E.Y. Hur, *Control of foam formation by antifoam during demineralization of crustacean shell in preparation of chitin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(9): p. 3844-3846.
26. Solomons, T.G. and C. Fryhle, *Organic Chemistry*, John Wiley&Sons. Inc., 6th ed, 2000: p. 646-931.
27. Chang, K.L.B., et al., *Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution*. Carbohydrate Research, 1997. **303**(3): p. 327-332.
28. Vårum, K.M., et al., *Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field nmr spectroscopy*. Carbohydrate Research, 1991. **211**(1): p. 17-23.
29. Kurita, K., T. Sannan, and Y. Iwakura, *Studies on chitin, 4. Evidence for formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero- and homogeneous hydrolyses*. Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics, 1977. **178**(12): p. 3197-3202.
30. Lamarque, G., C. Viton, and A. Domard, *Comparative study of the second and third heterogeneous deacetylations of α - and β -chitins in a multistep process*. Biomacromolecules, 2004. **5**(5): p. 1899-1907.
31. Islam, M.M., et al., *Preparation of chitosan from shrimp shell and investigation of its properties*. International Journal of Basic & Applied Sciences, 2011. **11**(1): p. 77-80.
32. Suyatma, N.E., *Développement de films biodégradables à base de chitosane: Etudes du mélange chitosane/PLA, de la plastification et de la compatibilisation*, 2006, Reims.
33. Crini, G. and P.-M. Badot, *Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: a review of recent literature*. Progress in polymer science, 2008. **33**(4): p. 399-447.
34. Onsøyen, E. and O. Skaugrud, *Metal recovery using chitosan*. Journal of chemical technology and biotechnology (Oxford, Oxfordshire: 1986), 1990. **49**(4): p. 395-404.
35. Brugnerotto, J., et al., *An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization*. Polymer, 2001. **42**(8): p. 3569-3580.
36. Kasai, M.R., et al., *The use of intense femtosecond laser pulses for the fragmentation of chitosan*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 1999. **120**(3): p. 201-205.
37. Heux, L., et al., *Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan*. Biomacromolecules, 2000. **1**(4): p. 746-751.
38. Lou, M.-M., et al., *Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen Burkholderia seminalis*. Carbohydrate research, 2011. **346**(11): p. 1294-1301.
39. Chen, R.H., J.R. Chang, and J.S. Shyr, *Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan*. Carbohydrate Research, 1997. **299**(4): p. 287-294.
40. Kasai, M.R., *Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data*. Carbohydrate polymers, 2007. **68**(3): p. 477-488.
41. Jaworska, M., et al., *Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties*. Polymer International, 2003. **52**(2): p. 198-205.
42. Ogawa, K., *Effect of heating an aqueous suspension of chitosan on the crystallinity and polymorphs*. Agricultural and biological chemistry, 1991. **55**(9): p. 2375-2379.
43. Nyström, B., A.-L. Kjøniksen, and C. Iversen, *Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity*. Advances in Colloid and Interface Science, 1999. **79**(2-3): p. 81-103.
44. Sorlier, P., et al., *Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan*. Biomacromolecules, 2001. **2**(3): p. 765-772.

45. Rinaudo, M., G. Pavlov, and J. Desbrieres, *Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan*. *Polymer*, 1999. **40**(25): p. 7029-7032.
46. Gylienė, O., O. Nivinskienė, and T. Vengris, *Sorption of tartrate, citrate, and EDTA onto chitosan and its regeneration applying electrolysis*. *Carbohydrate research*, 2008. **343**(8): p. 1324-1332.
47. Shahidi, F. and R. Abuzaytoun, *Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects*. *Advances in food and nutrition research*, 2005. **49**: p. 93-137.
48. Muzzarelli, R.A., *Chitin and its derivatives: new trends of applied research*. *Carbohydrate Polymers*, 1983. **3**(1): p. 53-75.
49. Dash, M., et al., *Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications*. *Progress in polymer science*, 2011. **36**(8): p. 981-1014.
50. Onesippe, C., *Étude des systèmes polyélectrolyte-tensioactif en phase aqueuse et à l'interface liquide-gaz: application à l'élaboration de micro-capsules*, 2005, Montpellier 2.
51. Kim, S.-K., *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications* 2010: CRC Press.
52. Khoshgozaran-Abras, S., et al., *Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based-films as a function of Aloe vera gel incorporation*. *Carbohydrate Polymers*, 2012. **87**(3): p. 2058-2062.
53. Crini, G., *Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review*. *Bioresource technology*, 2006. **97**(9): p. 1061-1085.
54. Muzzarelli, R.A., *Chitosan-based dietary foods*. *Carbohydrate Polymers*, 1996. **29**(4): p. 309-316.
55. Tripathi, P. and N. Dubey, *Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables*. *Postharvest biology and Technology*, 2004. **32**(3): p. 235-245.
56. Rabea, E.I., et al., *Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action*. *Biomacromolecules*, 2003. **4**(6): p. 1457-1465.
57. Agulló, E., et al., *Present and future role of chitin and chitosan in food*. *Macromolecular bioscience*, 2003. **3**(10): p. 521-530.
58. Oszmiański, J. and A. Wojdyło, *Effects of various clarification treatments on phenolic compounds and color of apple juice*. *European Food Research and Technology*, 2007. **224**(6): p. 755-762.
59. Konovalova, I., et al., *Recovery of lipids from aqueous dispersions with chitosan solutions*. *Russian journal of applied chemistry*, 2004. **77**(2): p. 254-259.
60. Speiciene, V., et al., *The effect of chitosan on the properties of emulsions stabilized by whey proteins*. *Food Chemistry*, 2007. **102**(4): p. 1048-1054.
61. Mao, L. and T. Wu, *Gelling properties and lipid oxidation of kamaboko gels from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) influenced by chitosan*. *Journal of Food Engineering*, 2007. **82**(2): p. 128-134.
62. Chen, T., et al., *Enzymatic grafting of hexyloxyphenol onto chitosan to alter surface and rheological properties*. *Biotechnology and bioengineering*, 2000. **70**(5): p. 564-573.
63. Wu, L.-Q., et al., *Utilizing renewable resources to create functional polymers: chitosan-based associative thickener*. *Environmental science & technology*, 2002. **36**(15): p. 3446-3454.
64. Chaussard, G., *Elaboration de biomatériaux innovants à partir de chitine et chitosane issus de plumes de calmar en vue d'une application biomédicale*, 2002, Thèse, Université Claude Bernard Lyon 1.
65. Bacon, A., et al., *Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens*. *Infection and immunity*, 2000. **68**(10): p. 5764-5770.
66. Muzzarelli, R. and C. Muzzarelli, *Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences*. *Polysaccharides I*, 2005: p. 151-209.

67. Prabakaran, M. and J. Mano, *Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems*. Drug delivery, 2004. **12**(1): p. 41-57.
68. Desbrieres, J., *Chitin and chitosan [Chitine et chitosane]*. Actualite Chimique, 2002(11-12): p. 39-44.
69. Bautista-Baños, S., et al., *Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities*. Crop protection, 2006. **25**(2): p. 108-118.
70. Gerente, C., et al., *Application of chitosan for the removal of metals from wastewaters by adsorption—mechanisms and models review*. Critical reviews in environmental science and technology, 2007. **37**(1): p. 41-127.
71. Domard, A. and E. Piron, „Recent approach of metal binding by chitosan and derivatives, *Adv. Chitin Sci*, 2000. **4**: p. 295-301.
72. Piron, E., M. Accominotti, and A. Domard, *Interaction between chitosan and uranyl ions. Role of physical and physicochemical parameters on the kinetics of sorption*. Langmuir, 1997. **13**(6): p. 1653-1658.
73. Krajewska, B., *Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials*. Separation and purification technology, 2005. **41**(3): p. 305-312.
74. Dutkiewicz, J.K., *Superabsorbent materials from shellfish waste—a review*. Journal of biomedical materials research, 2002. **63**(3): p. 373-381.
75. Ping, L., Z. Jianlin, and W. Aiqin, *Progress in analytical chemistry of chitosan and its derivatives*. Progress in Chemistry, 2006. **18**(04): p. 467.
76. Struszczyk, M.H., *Chitin and chitosan. Part II. Applications of chitosan*. Polimery, 2002. **47**: p. 396-403.
77. Guibal, E., *Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review*. Progress in Polymer Science, 2005. **30**(1): p. 71-109.
78. Linder, R., *Les plans d'expériences: un outil indispensable à l'expérimentateur* 2005: Presses des Ponts.
79. Tinsson, W., *Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques*. Vol. 67. 2010: Springer Science & Business Media.
80. Belkadi, T. and L. Maked, *Traitement des margines d'olives par co-précipitation en utilisant les plans d'expériences*, 2016, UMMTO.
81. Droesbeke, J.-J., J. Fine, and G. Saporta, *Plans d'expériences: applications à l'entreprise* 1997: Editions technip.
82. Goupy, J., *Plans d'expériences pour surfaces de réponse*. 1999.
83. Hassiba, L.-H., et al., *Beta-Chitosane as a Treatment for Ulcerative Colitis: Therapeutic Effectiveness and Possible Mechanisms of Action*. 2021.
84. Al Sagheer, F., et al., *Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf*. Carbohydrate polymers, 2009. **77**(2): p. 410-419.
85. Kumari, S., et al., *Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method*. Environmental Technology & Innovation, 2015. **3**: p. 77-85.
86. Tayeb, H., *ACETATE DE CELLULOSE, SYNTHÈSE, PROPRIETES ET APPLICATIONS*.
87. Domard, A. and M. Rinaudo, *Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan*. International Journal of Biological Macromolecules, 1983. **5**(1): p. 49-52.
88. Singh, A., S. Benjakul, and T. Prodpran, *Ultrasound-assisted extraction of chitosan from squid pen: Molecular characterization and fat binding capacity*. Journal of food science, 2019. **84**(2): p. 224-234.
89. De Lima, C.J., L.F. Coelho, and J. Contiero, *The use of response surface methodology in optimization of lactic acid production: focus on medium supplementation, temperature and pH control*. Food Technology and Biotechnology, 2010. **48**(2): p. 175-181.
90. Hwang, K.T., et al., *Controlling molecular weight and degree of deacetylation of chitosan by response surface methodology*. Journal of agricultural and food chemistry, 2002. **50**(7): p. 1876-1882.

91. Tsaih, M.L. and R.H. Chen, *The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan*. Journal of applied polymer science, 2003. **88**(13): p. 2917-2923.
92. Weska, R., et al., *Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology*. Journal of Food Engineering, 2007. **80**(3): p. 749-753.

Annexe

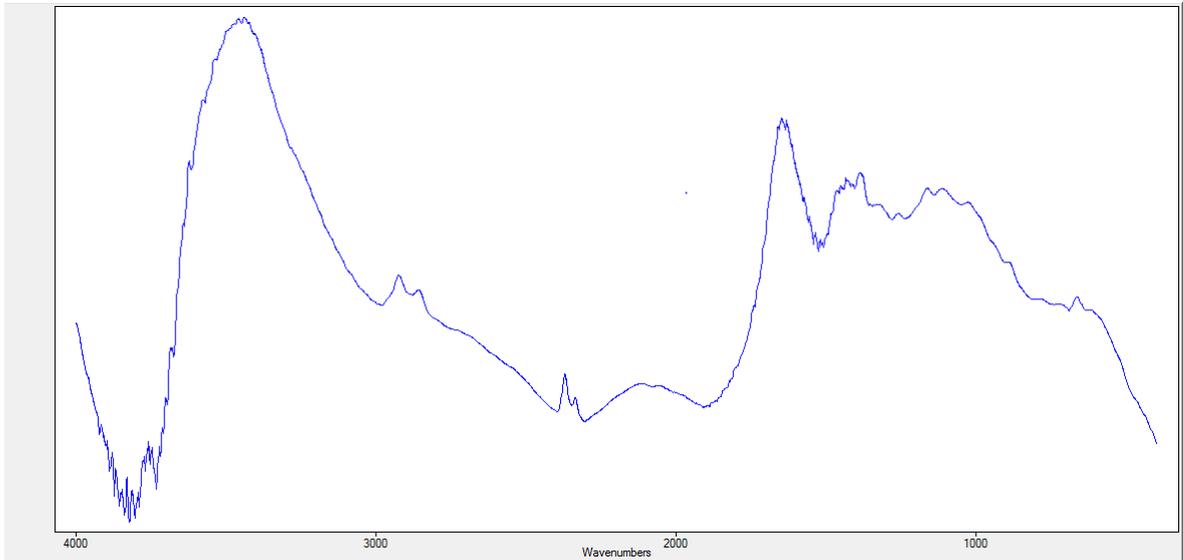


Figure 1 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°2.

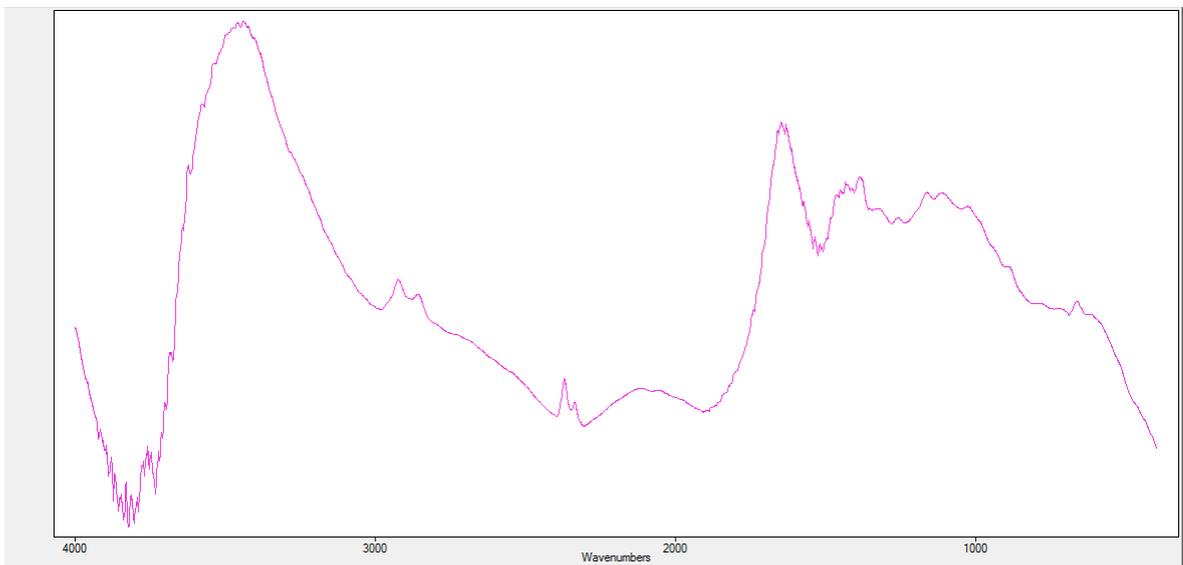


Figure 2 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°3.

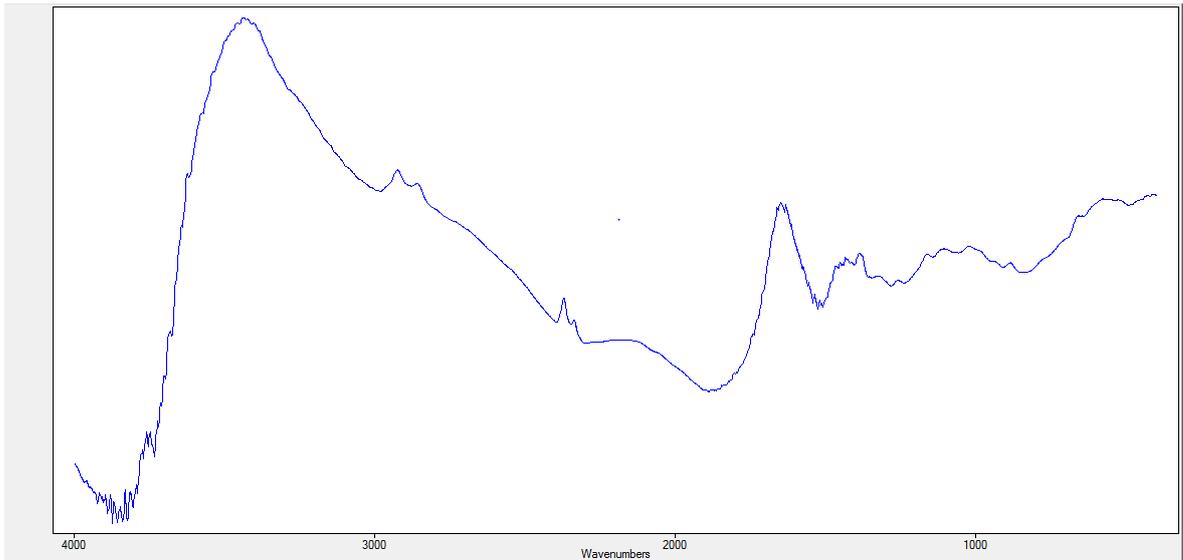


Figure 3 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°4.

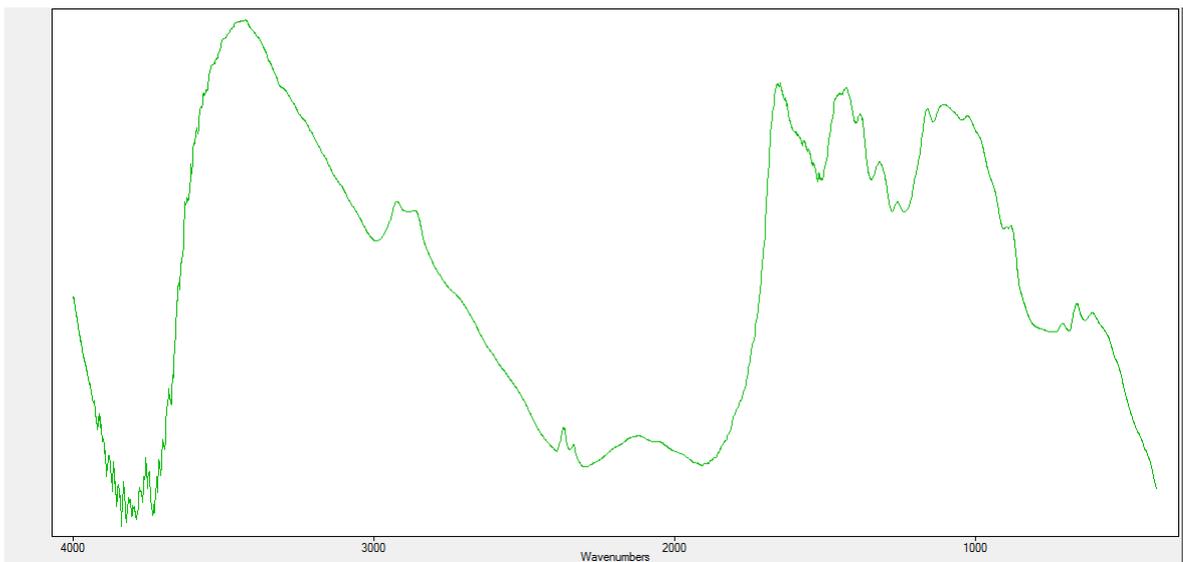


Figure 4 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°5.

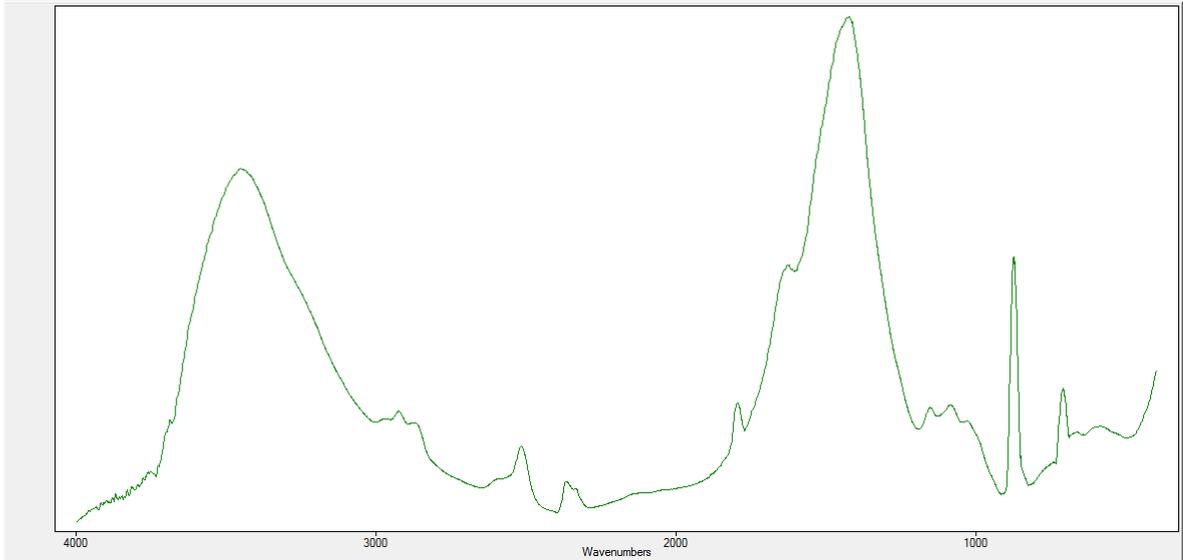


Figure 5: Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°6.

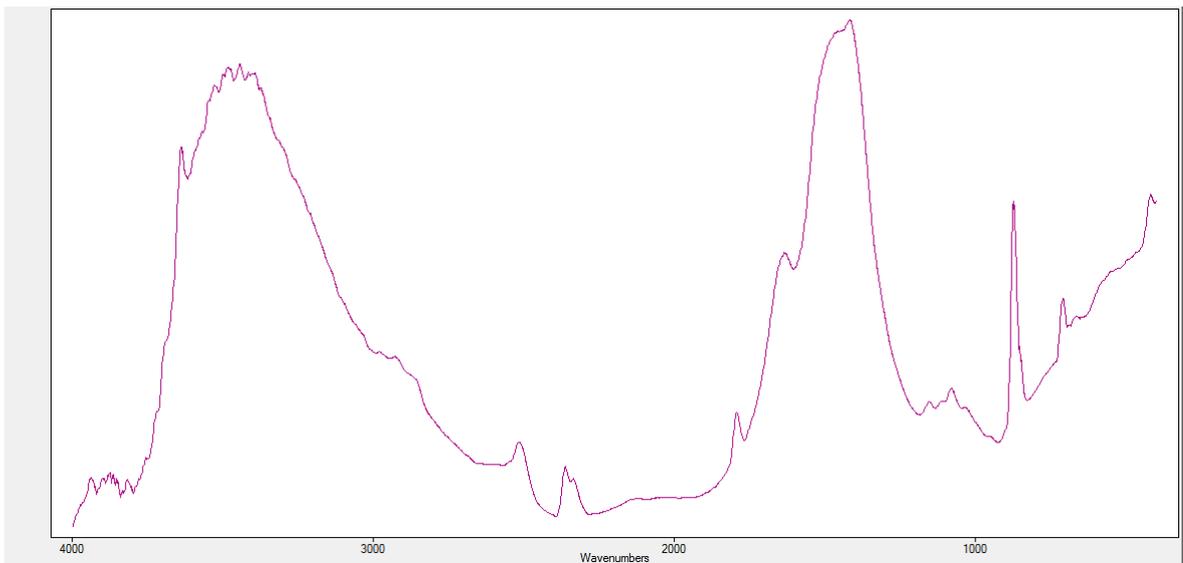


Figure 6 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°7.

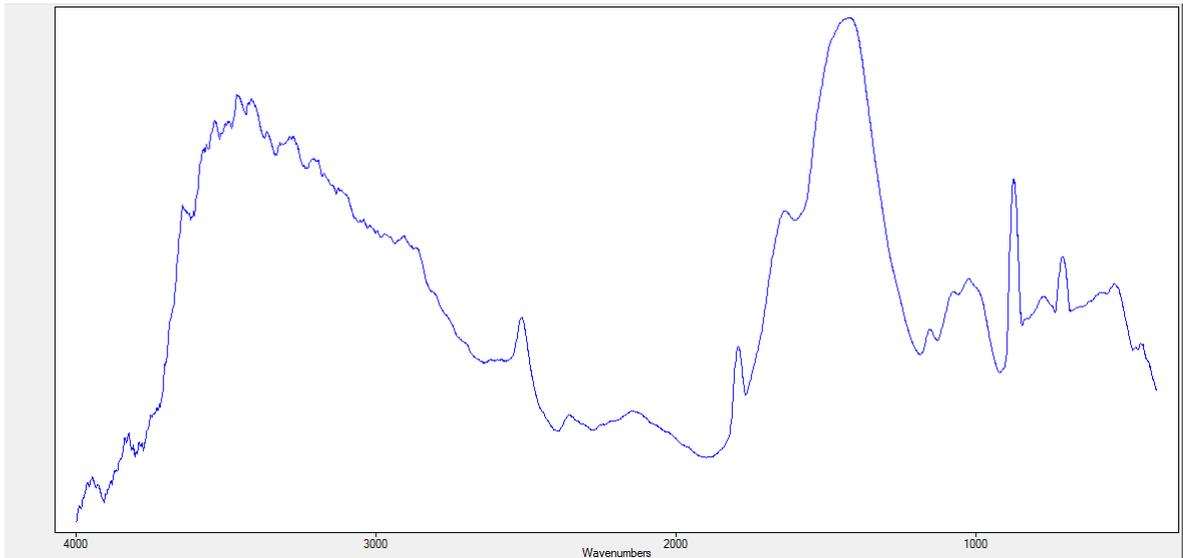


Figure 7 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°8.

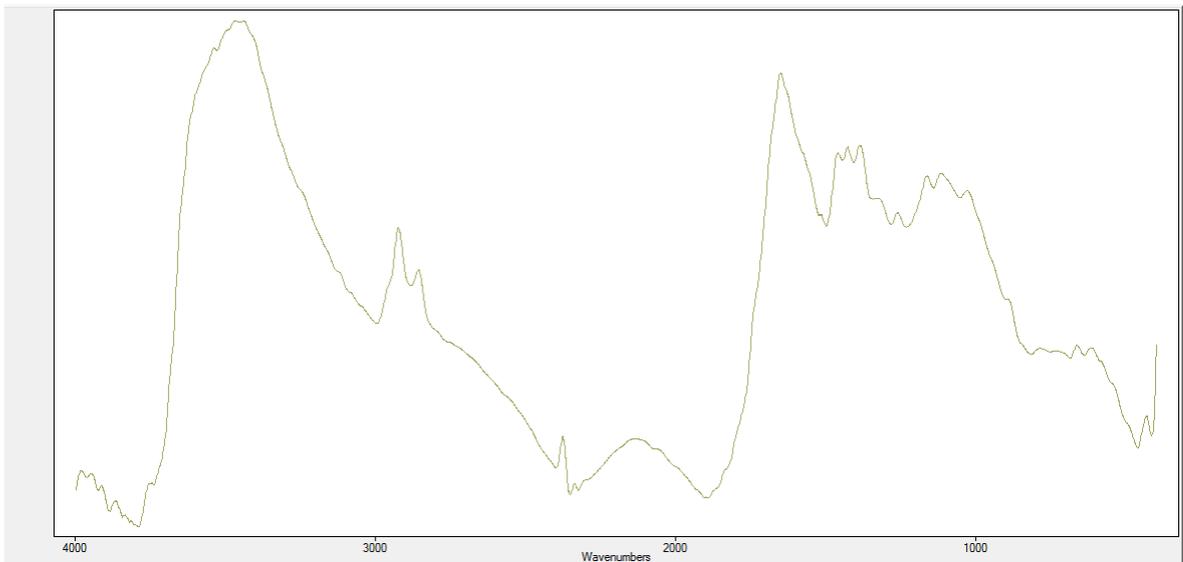


Figure 8 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°9.

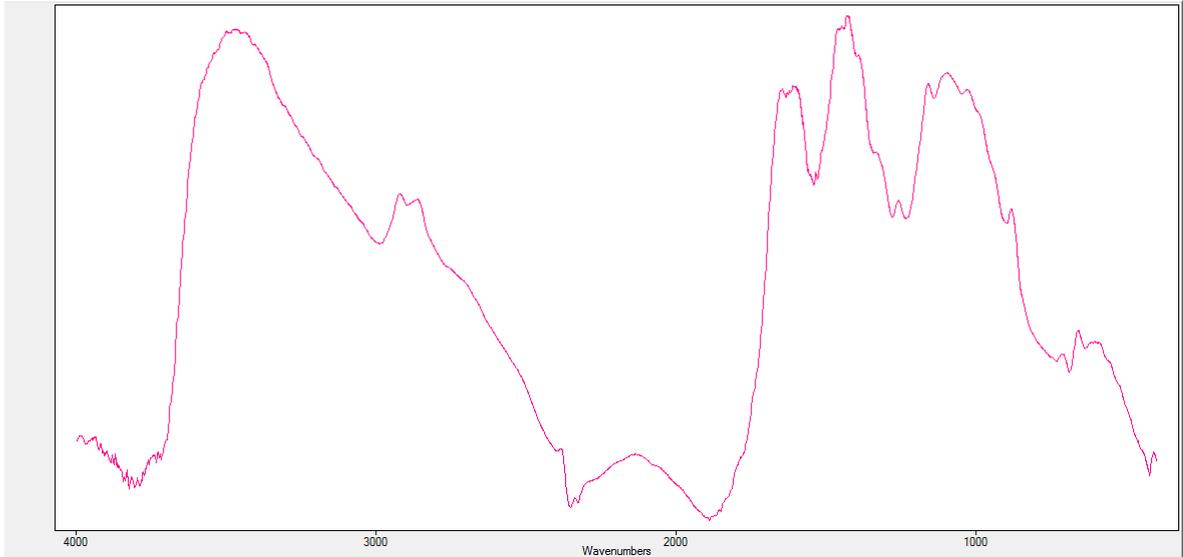


Figure 9 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°10.

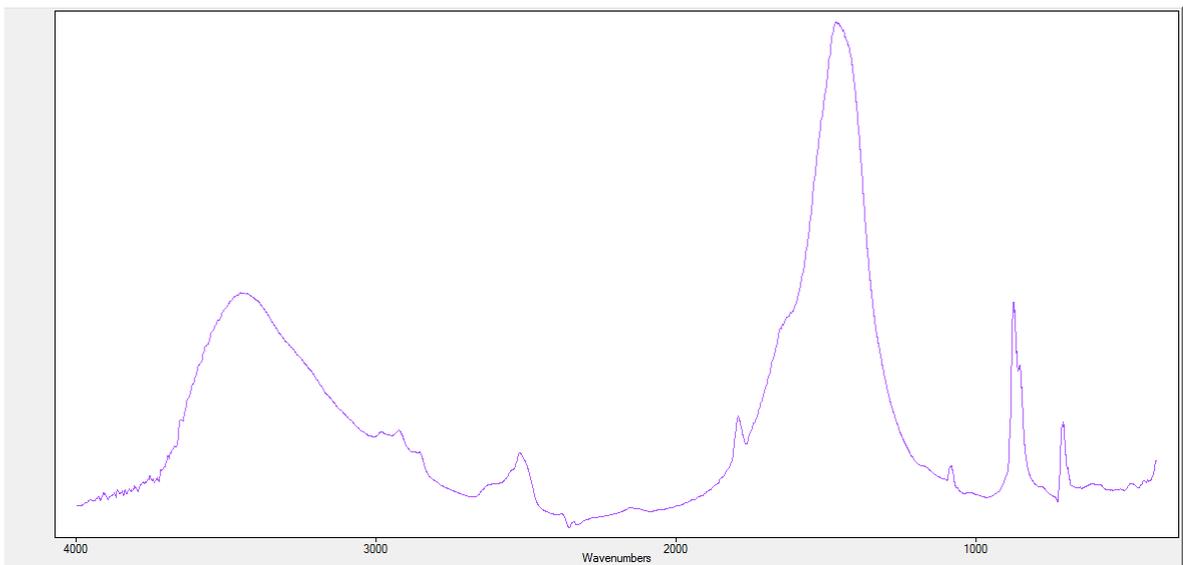


Figure 10 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°11.

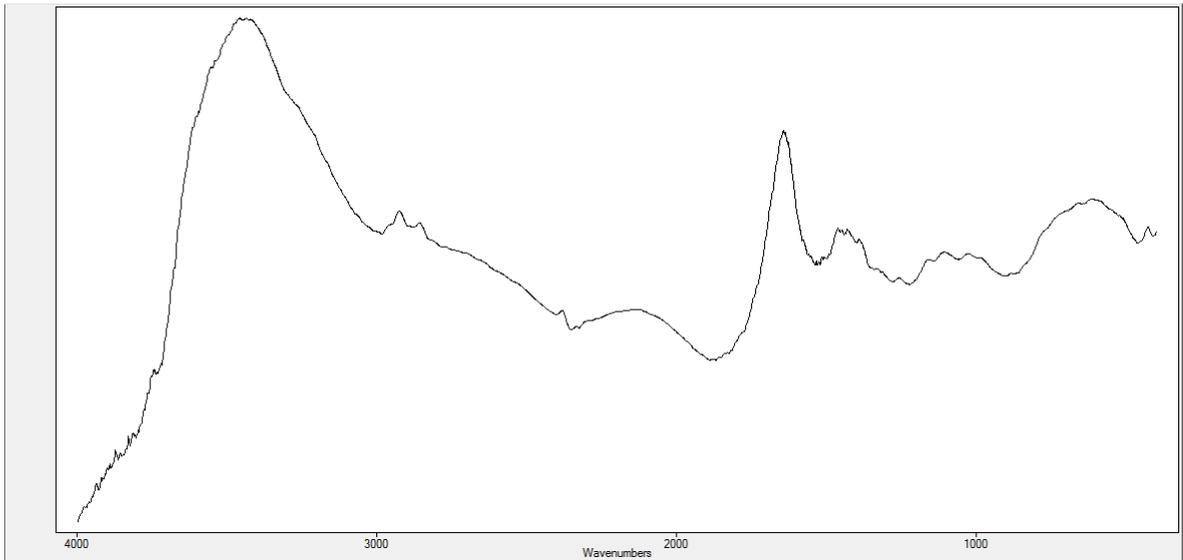


Figure 11 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°12.

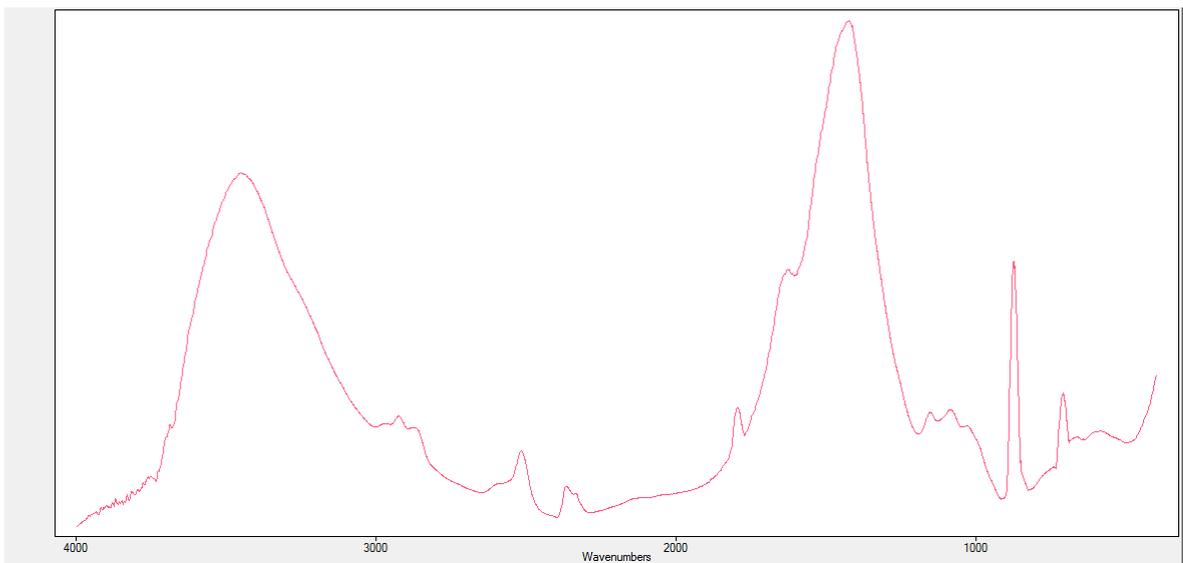


Figure 12 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°13.

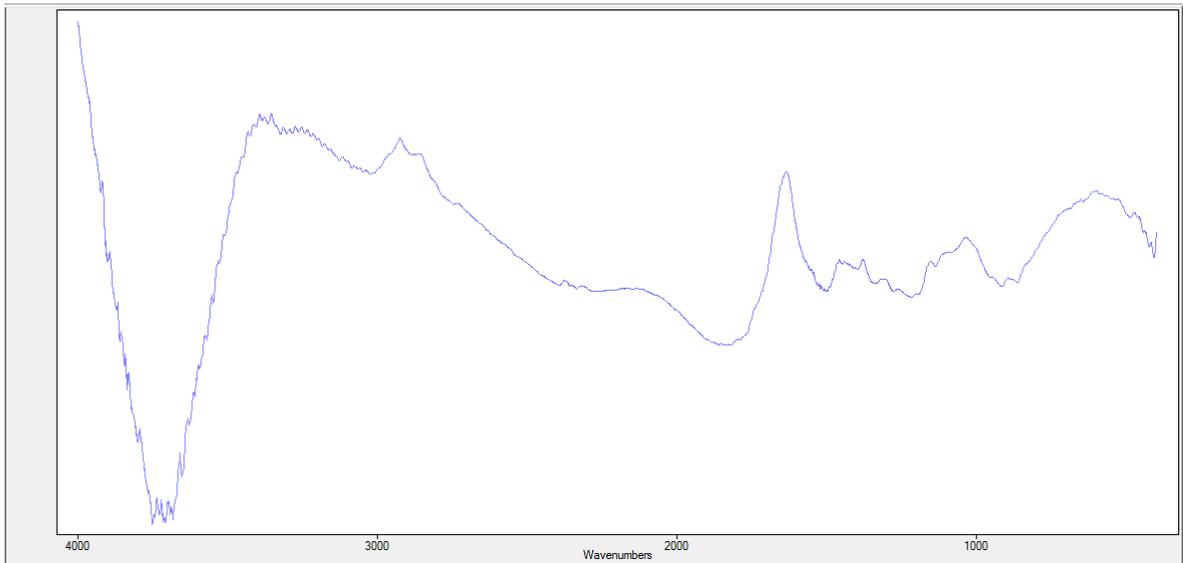


Figure 13 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°14.

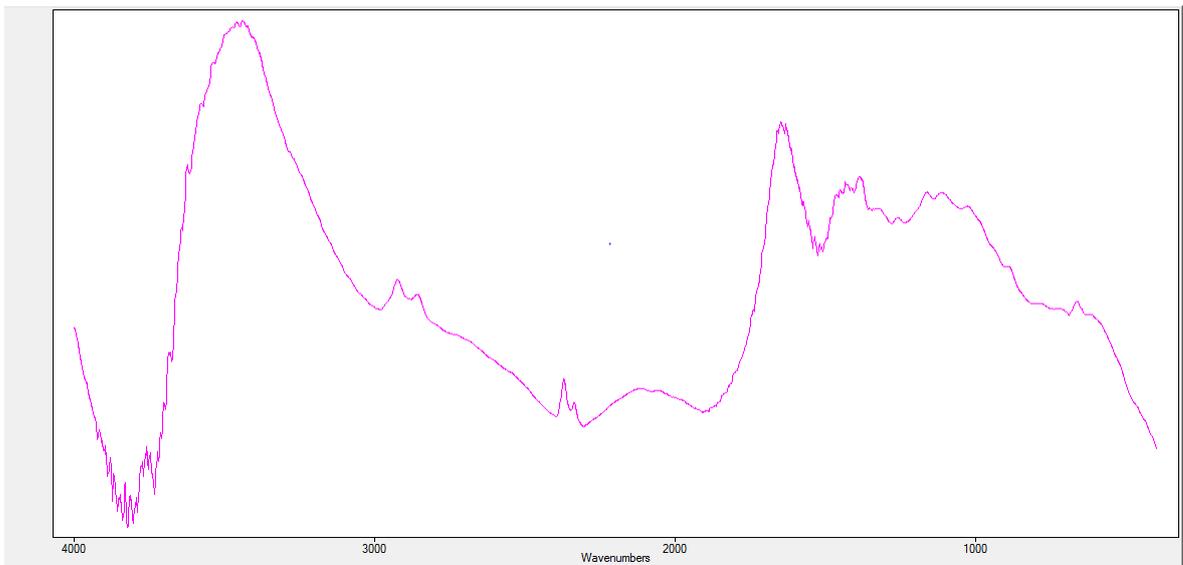


Figure 14 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°15.

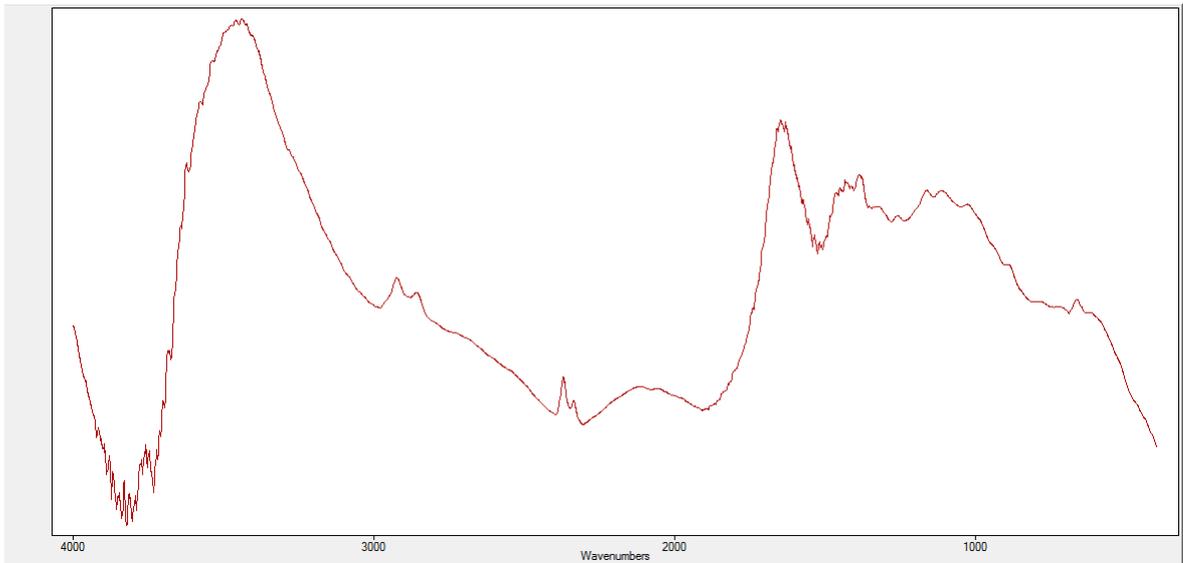


Figure 15 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°16.

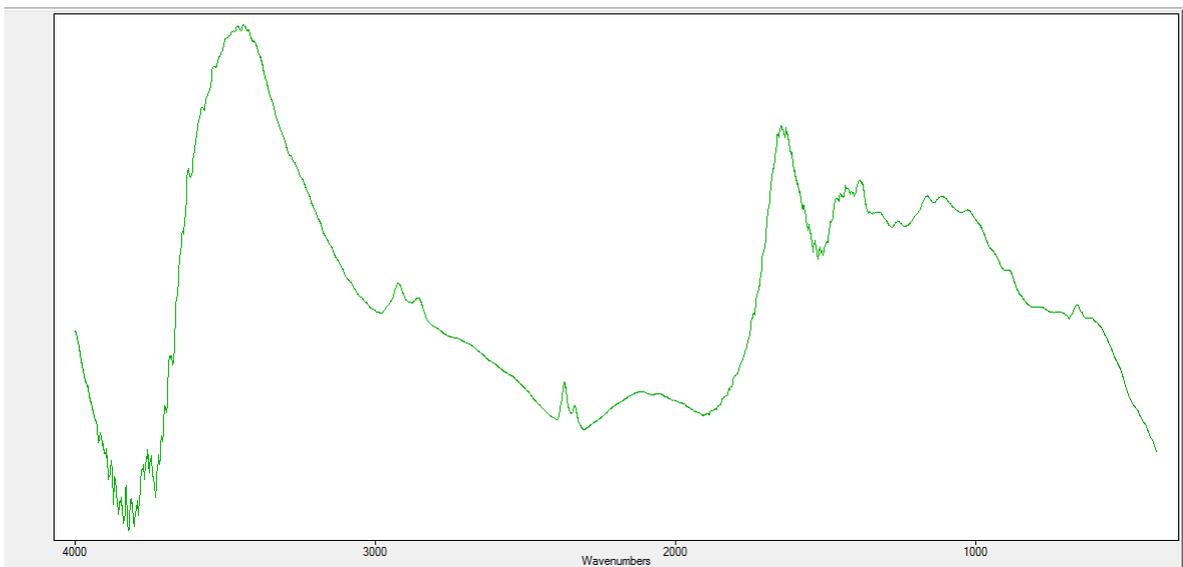


Figure 16 : Spectre infrarouge du chitosane de l'expérience N°17.