

UNIVERSITE DE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences
Département de Chimie

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : La chimie moléculaire des complexes de coordination

LE COMPLEXE CHITOSANE-CUIVRE (II) : SYNTHÈSE, CARACTÉRISATION ET ÉTUDE DE L'EFFET DE SA STRUCTURE SUR SON ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE

Par

MEKAHLIA Soumia

Devant le jury composé de

R. BELAL	Professeur, U. de Blida	Président
K. E. BAL	Professeur, C.U. de Khemis-Miliana	Examineur
S. MOULAY	Professeur, U. Blida	Examineur
B. BOUZID	Maître de conférence	Rapporteur

Blida, Juin 2007

RESUME

La chitine et le chitosane sont des biopolymères présentant un grand intérêt pour la recherche en ce qui concerne la chélation des ions métalliques et leurs applications en tant que complexes polymère-métal.

Le but de ce travail est de synthétiser et caractériser le complexe chitosane-cuivre tout en étudiant l'effet de la structure du complexe, en variant le rapport molaire (unité glucosamine : cuivre) sur son activité antibactérienne contre *salmonella enteritidis*.

Cette étude décrit l'extraction de la chitine à partir des carapaces des crevettes rouges et sa conversion en chitosane. Ces biomatériaux ont été caractérisés par spectrométrie IR, diffraction des rayons X (DRX), et par analyse élémentaire. Le degré de désacétylation de la chitine et du chitosane sont respectivement 78.31% et 85.94%.

On a procédé à la préparation de sept complexes chitosane-cuivre avec différent contenu en cuivre. Ces complexes ont été caractérisés par la spectrométrie IR, spectrophotométrie UV-VIS, analyse élémentaire, diffraction des rayons X et par la spectrométrie d'absorption atomique (SAA). SAA a confirmé qu'ils se sont formés dans des rapports molaires (unité glucosamine : cuivre) de 6:1, 4:1, 3:1, 1:0.4, 1:0.8, 1:0.9, 1:1, six structures correspondantes aux différents rapports de chélation ont été proposées.

L'activité antibactérienne, in vitro, de ces complexes a été évaluée qualitativement et quantitativement. Le taux d'inhibition la concentration d'inhibition minimale (CIM) et la concentration bactéricide minimale (CBM) de ces complexes ont été déterminées et comparées avec ceux du chitosane.

Tous les résultats ont montré que les complexes chitosane-cuivre, spécialement ceux de rapport molaire autour ou égal à 1 :1, sont des candidats potentiels en tant que nouveaux agents antibactériens qui peuvent être utilisé dans la protection de l'environnement et la santé humaine contre *salmonella enteritidis*.

ABSTRACT

Chitin and chitosan are biopolymers of great interest to research concerning their chelating power to metal ions and their applications as polymer- metal complexes.

The aim of this work is synthesize and characterization of the chitosan-Cu(II) complex and the study of the complex structure effect, by varying the molar ratio glucosamine unit: copper, on its antibacterial activity against *salmonella enteritidis*.

This study describes the extraction of chitin from red shrimp shell and its conversion into chitosan. These biomaterials were characterized by spectroscopy FT-IR, X-ray diffraction (XRD), and elemental analysis. The degree of deacetylation of chitin and chitosan were 78.31% and 85.94%, respectively.

Seven chitosan–copper complexes with different copper concentrations were prepared and characterized by FT-IR, UV-VIS, X-ray diffraction (XRD), elemental analysis and atomic adsorption spectrometry (AAS). AAS confirms that they were of a molar ratio (glucosamine unit : copper) of 6:1, 4:1, 3:1, 1:0.4, 1:0.8, 1:0.9, 1:1, six possible structures corresponding to different chelate ratios were proposed.

In vitro qualitative and quantitative tests were carried out. Inhibition rate, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of these complexes were evaluated and compared with chitosan antibacterial activity.

All results have shown that chitosane-copper complex, in particular the approximately or 1:1 chitosan-copper complex, are potential candidates as new antibacterial agents which can be used against *salmonella enteritidis*.

REMERCIEMENTS

Cet opuscule serait incomplet si je ne témoignerais pas de ma profonde gratitude envers grand dieu qui ma conduit à ce que je suis aujourd'hui par sa bienveillance et sa générosité. Toutes les expressions de remerciement ne suffiront jamais pour traduire ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

Un grand merci est adressé au rapporteur de mon mémoire, monsieur le docteur B. Bouzid. Je le remercie pour l'intérêt qu'il a porté à ce manuscrit.

Je remercie mon enseignant, monsieur le Professeur K. E. Bal qui nous a longtemps parlé du chitosane durant son cours de l'année théorique. Je le remercie également pour sa participation au jury.

Mes vifs remerciements sont aux membres du jury dont la présence donne une dimension supplémentaire à ce travail et m'oblige à fournir plus d'effort pour être à la hauteur de leurs espérances. Tous mes remerciements sont à monsieur le professeur R. Belal d'avoir accepter de présider le jury. Je vous prie d'accepter du fond du cœur mes remerciements et toute ma reconnaissance.

Tous mes remerciements sont aux responsables des laboratoires qui ont accueilli ce projet. Il s'agit de Mr M. Tabat, directeur du laboratoire de l'analyse de l'eau de l'ANRH, Monsieur le professeur R. Belal, responsable du laboratoire de Chimie Physique Moléculaire et Macromoléculaire, et Mr R. Hmida, responsable du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida.

Je tiens à remercier également Monsieur A. Boulahouache, le chef de département de chimie et Monsieur A. Khelifa le chef de département de chimie industrielle, pour leur permission de disposer de produits et d'analyser mes échantillons.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à toutes les personnes qui m'ont aidé de prêt ou de loin à mener à bien ce projet. Il s'agit de mon frère Adel, Mr A. Benmaalem, Mr S. Aoudj, Mr S. Lemmou, Melle N. Hachache, Mr J. Tefahi, Melle Z. Aliche, Mr L. Benataallah, Mr R. Herida et Mr A. Bouaziz. Leur aide était vraiment précieuse et déterminante à ma réussite.

Je saisis cette occasion pour leur présenter ma sincère gratitude et ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements les plus sincères sont à la direction de l'université de Blida qui a pensé à mettre à notre disposition un trésor de littérature « science direct » : la source précieuse de publications grâce au quelle j'ai pu aboutir à mon but.

Mes vifs remerciements sont à mes directeurs et mes collègues de travail aux écoles de Sidi El Mahfoud et El Khaldounia de Boufarik. Un remerciement spécial est à Mr M. Metairia, Mme K. Touati, Melle N. Lardjoum, et Mr B. Abderrahmane pour leur compréhension durant l'année théorique de mon inscription au magister.

Finalement, toute ma gratitude va à mes parents qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont aidé et encouragé tout au long de mes études. Un grand merci est à mes frères et sœurs. Un remerciement particulier est à ma maman qui a supporté ma paresse durant toute la période de mon projet et pendant la période ardue qu'est la rédaction.

TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION	12
1. LA CHITINE ET LE CHITOSANE	15
1.1. Introduction.....	15
1.2. Histoire de la chitine et du chitosane	18
1.3. Source de la chitine et du chitosane	19
1.4. Production de la chitine et du chitosane	21
1.4.1. La méthode chimique traditionnelle	21
1.4.2. Les méthodes biologiques	23
1.5. Facteurs affectant la production du chitosane	24
1.6. Les propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane	27
1.6.1. Le degré de désacétylation (DD)	28
1.6.1.1. Définition	28
1.6.1.2. Détermination du degré de désacétylation	28
1.6.2. La viscosité et le poids moléculaire	34
1.6.3. La solubilité	36
1.6.4. La cristallinité	36
1.7. Applications du chitosane	37
1.7.1. Applications médicales	38
1.7.2. Traitement des eaux	39
2. LES COMPLEXES METALLIQUES DU CHITOSANE	42
2.1. L'interaction chitosane-ion métallique	42
2.2. L'affinité du chitosane envers les métaux	43
2.3. Mécanismes d'interaction	44
2.3.1. Chélation	45
2.3.2. Attractions électrostatiques/ échange d'ions	45
2.4. Paramètres influant l'interaction chitosane-ion métallique	46
2.5. L'interaction chitosane-cuivre (II)	47
2.6. Formation des complexes chitosane-ion métallique	49
2.7. Applications des complexes chitosane-ion métallique	50
2.7.1. La dégradation du chitosane	50
2.7.2. Applications catalytiques	52
2.7.3. Application comme agent antibactérien	53
2.7.3.1. Mécanismes de l'activité antibactérienne	53
2.7.3.2. Les paramètres influant l'activité antibactérienne du Chitosane	55
2.7.3.2.1. Effet des caractéristiques du chitosane	55
2.7.3.2.2. Effet des propriétés de charge des parois cellulaires des bactéries	57
3. MATERIAUX ET ESSAIS	59

3.1. Extraction de la chitine et sa conversion en chitosane	60
3.1.1. Extraction de la chitine	60
3.1.1.1. Source naturelle employée	60
3.1.1.2. La déprotéinisation	61
3.1.1.3. La déminéralisation	61
3.1.1.4. La décoloration	62
3.1.1.5. Le séchage	62
3.1.2. Préparation du chitosane	62
3.1.3. Caractérisation de la chitine et du chitosane	63
3.1.3.1. Caractérisation par la spectrométrie IRTF.....	63
3.1.3.2. Caractérisation par l'analyse élémentaire	64
3.1.3.3. Caractérisation par la diffraction des rayons X (DRX)	64
3.1.3.4. Mesure de la viscosité et détermination du poids	
moléculaire	64
3.1.3.5. Titrage potentiométrique	65
3.2. Formation des complexes chitosane-cuivre	67
3.2.1. Prétaillement du chitosane	67
3.2.2. Formation des complexes	67
3.2.3. Caractérisation des complexes	69
3.2.3.1. Caractérisation par la spectrométrie IRTF	69
3.2.3.2. Caractérisation par la spectrophotométrie UV-VIS ...	69
3.2.3.3. Caractérisation par l'analyse élémentaire	70
3.2.3.3. Caractérisation par la diffraction des rayons X	70
3.2.3.4. Caractérisation par SAA	70
3.3. Application antibactérienne du chitosane et des sept complexes	72
3.3.1. Mode opératoire	74
3.3.1.1. Produits et moyens utilisés	74
3.3.1.2. L'obtention des colonies de salmonelle	74
3.3.1.3. Préparation de la suspension de bactérie	74
3.3.1.4. Préparation et stérilisation des solutions des produits	76
3.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des produits	76
3.3.2.1. Evaluation qualitative	76
3.3.2.2. Evaluation quantitative	77
3.3.2.2.1. Détermination des CIM	78
3.3.2.2.2. Détermination de CBM	79
3.3.2.3. Analyse statistique des résultats	79
4. RESULTATS ET INTERPRETATIONS	81
4.1. Extraction de la chitine et sa conversion en chitosane	81
4.1.1. Rendement des réactions	81
4.1.2. Identification de la chitine et du chitosane	81
4.1.2.1. Identification de la chitine et du chitosane par IRTF ..	82
4.1.2.1.1. Présentation des résultats	82
4.1.2.1.2. Interprétation des spectres IRTF	94
4.1.2.2. Identification par analyse élémentaire	95
4.1.2.3. Identification par DRX	96
4.1.3. Détermination du degré de désacétylation	97
4.1.3.1. Détermination du DA de la chitine	97
4.1.3.2. Détermination du DD du chitosane	100

4.1.3.2.1. Détermination du DD par IRTF	100
4.1.3.2.2. Détermination du DD par titrage potentiométrique	100
4.1.4. Mesure de la viscosité et détermination du poids moléculaire du chitosane	102
4.2. Identification des complexes	105
4.2.1. Identification des complexes par IRTF	105
4.2.1.1. Interprétation des spectres du premier groupe	106
4.2.1.2. Interprétation du spectre du deuxième groupe	112
4.2.1.3. Interprétation des spectres du troisième groupe	112
4.2.1.4. Interprétation du spectre du quatrième groupe	117
4.2.2. Identification des complexes par analyse élémentaire	120
4.2.3. Identification des complexes par UV-VIS	121
4.2.4. Identification des complexes par DRX	122
4.2.5. Identification des complexes par SAA	127
4.2.6. La structure la plus probable des complexes synthétisés	128
4.3. Test de l'activité antibactérienne contre la salmonelle	131
4.3.1. Détermination du taux d'inhibition	131
4.3.2. Détermination de CIM	131
4.3.3. Détermination de CBM	131
4.3.4. Interprétation des résultats	136
4.3.5. Analyse statistique des résultats	139
CONCLUSION	142
REFERENCES	

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	La structure chimique de (a) la chitine, (b) le chitosane et (c) la cellulose [24]	17
Figure 1.2	Les deux unités présentes dans la chitine et le chitosane [26]..	17
Figure 1.3	Schémas des principales étapes de l'extraction de la chitine et sa conversion en chitosane [24].....	23
Figure 1.4	La courbe de titrage dans la méthode de Broussignac [67]	32
Figure 2.1	la sélectivité ionique du chitosane : la quantité (moles) de cations divalents et trivalents fixée par g de film. [112]	44
Figure 2.2	Les structures des complexes chitosane –cuivre (II) disponibles dans la littérature : (a [66]) et (b [19])	48
Figure 2.3	la dégradation du chitosane sous l'effet des liaisons de coordination [10]	52
Figure 3.1	Les carapaces des crevettes rouges, a : la partie abdominale, b : la partie restante	60
Figure 3-2	La gélose Hektoen a : avant incubation, b : après incubation	71
Figure 4.1	Le spectre IRTF du produit issu de la partie abdominale des carapaces (la chitine)	81
Figure 4.2	Le spectre IRTF du produit issu de la partie restante des Carapaces	82
Figure 4.3	Le spectre IRTF du chitosane	83
Figure 4.4	Le spectre IR du chitosane contaminé.....	84
Figure 4.5	Le spectre IR du chitosane nettoyé	85
Figure 4.6	Spectre IRTF de ; a : α -chitine et b : β -chitine [146]	86
Figure 4.7	Spectre IRTF du chitosane de DD de 92% préparé à partir des carapaces des crevettes [147]	87
Figure 4.8	Spectre IRTF du chitosane [47].....	87
Figure 4.9	Le diffractogramme de la chitine	92
Figure 4.10	Le diffractogramme du chitosane	93
Figure 4.11	Variation du pH en fonction du volume de NaOH	94
Figure 4.12	Détermination de la viscosité intrinsèque par la droite de Huggins	95
Figure 4.13	Le spectre IR du complexe 5 (2 : 1)	99
Figure 4.14	Le spectre IR du complexe 6 (3 : 1)	100
Figure 4.15	Le spectre IR du complexe 7(4 : 1)	101
Figure 4.16	Le spectre IRTF du complexe 1 (1 : 1)	103
Figure 4.17	Le spectre IRTF du complexe 2 (1 : 2)	104
Figure 4.18	Le spectre IRTF du complexe 3 (1 : 3)	105
Figure 4.19	Le spectre IRTF du complexe 4 (1 : 4)	108
Figure 4.20	Le spectre UV des complexes 5, 6, et 7.....	112
Figure 4.21	Le spectre UV des complexes 1, 2, et 3	112
Figure 4.22	Le spectre UV du complexe 4	113
Figure 4.23	La bande d-d du complexe 1	113

Figure 4.24	La bande d-d du complexe2	114
Figure 4.25	La bande d-d du complexe3	114
Figure 4.26	La bande d-d du complexe4	115
Figure 4.27	La bande d-d du complexe5	115
Figure 4.28	La bande d-d du complexe6	116
Figure 4.29	La bande d-d du complexe7	116
Figure 4.30	Le diffractogramme du complexe 6	117
Figure 4.31	Le diffractogramme du complexe 7	118
Figure 4.32	Les structures proposées des complexes	121
Table 1.1	Pourcentage de la chitine dans ses principales sources naturelles. [24,32].	21
Table 1.2	Les formules utilisées dans la détermination du DD du chitosane	32
Table 1.3	Les constantes de MH avec plusieurs solvants disponibles dans la littérature.	36
Table 2.1	Les caractéristiques d'adsorption (la constante de dissociation apparente de Langmuir (Kd) et la capacité maximale de l'adsorbant (q_m)) de quelques formes de chitosane envers le cuivre [35]	50
Table 2.2	La quantité de chitosane adsorbée (μg de chitosane / 10^9 bactérie / ml) sur les différentes cellules bactériennes, en fonction du pH et du DD. [34]	59
Table 3.1	Le rapport molaire correspondant à chaque complexe ...	68
Table 3.2	La quantité de cuivre utilisée dans la formation de chaque complexe	68
Table 4.1	Les masses (g) des carapaces utilisées, la chitine et le chitosane obtenus	82
Table 4.2	Pourcentages expérimentaux et calculés (entre parenthèse) du carbone, hydrogène, et d'azote dans la chitine et chitosane.	90
Table 4.3	Les masses des complexes formés à partir de 0.5 g de chitosane	96
Table 4.4	Pourcentages expérimentaux et calculés (entre parenthèse) de carbone, hydrogène, et d'azote dans les complexes chitosane-cuivre synthétisés	109
Table 4.5	Les pics d'absorption UV-VIS des complexes chitosane-cuivre préparés	111
Table 4.6	Les résultats obtenus de la spectrométrie d'absorption atomique	119
Table 4.7	Les absorbances des solutions (produit + bactérie avant et après incubation)	124
Table 4.8	Le taux d'inhibition du chitosane et des complexes chitosane-cuivre	124
Table 4.9	Les valeurs de CIM en mg/ml	125
Table 4.10	Classement des produits par perfection de leur activité antibactérienne	126
Table 4.11	Les valeurs de CBM en mg/ml	127
Table 4.12	Comparaison entre l'activité antibactérienne du chitosane avec les antibiotiques standards contre <i>S. enterica</i> , <i>S. enterica</i> var. <i>Paratyphi-A</i> et <i>S. enterica</i> var. <i>Paratyphi-B</i> [162]	131
Table 4.13	Les résultats du calcul statistique	133

LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

a	: la constantes de Mark - Houwink
ADN	: Acide desoxyribonucleique
ARN	: Acide ribonucléique
AESN	: association européenne de saucisse naturelle
ANRH	: Agence nationale des ressources hydrauliques
C	: concentration
CBM	: concentration bactéricide minimale
CIM	: concentration inhibitrice minimale
CRD	
SAIDAL	: Centre de recherche développée SAIDAL
Da	: Dalton
DA	: Degré d'acétylation
DD	: Degré de désacétylation
DM	: déminéralisation
DP	: Déprotéinisation
DRX	: Diffraction des rayons X
DSA	: Désacétylation
HOAC	: acide acétique
ICr	: indice de cristallinité
IR	: Infrarouge
IRTF	: Infrarouge à transformée de Fourier
K	: constantes de Mark - Houwink
Kd	: constante de dissociation apparente de Langmuir
KDa	: Kilo Dalton
MH	: Mark-Houwink
NaAC	: acétates de sodium
ppb	: partie par billion
ppm	: partie par million
Qm	: la capacité d'adsorption maximale
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
RMN du ¹ H	: Résonance magnétique nucléaire du proton
RMN du ¹³ C	: Résonance magnétique nucléaire du carbone 13
rpm	: Rotation par minute
SAA	: Spectrométrie d'absorption atomique
UV	: Ultraviolet
UV-VIS	: Ultraviolet- Visible
δ	: la bande de vibration de déformation
v	: la bande de vibration d'allongement

λ_{\max} : la longueur d'onde d'adsorption maximale
 η : La viscosité
 $[\eta]$: La viscosité intrinsèque

INTRODUCTION

L'utilisation quotidienne des produits antibactériens a pris son rôle dans la santé humaine et dans l'environnement à travers leur utilisation comme des médicaments [1]. Cependant, la résistance aux effets des antimicrobiens est un sérieux problème.

Ce problème, souvent appelé « résistance aux antimicrobiens » ou RAM, coûte des vies et de l'argent et menace notre capacité à traiter les infections chez les humains et chez les animaux. [2]

Une bactérie peut acquérir une résistance aux antimicrobiens quand une mutation génétique se produit dans l'organisme ou lorsqu'elle acquiert des gènes de résistance existants dans un autre organisme. [2]

La résistance aux antibiotiques des bactéries à gram négatif concerne de nombreuses bactéries et recouvre un ensemble hétérogène aussi bien dans ses mécanismes de résistance et sa sélection que son potentiel de dissémination. [3]

Les céphalosporines, les fluoroquinolones et les cotrimoxazoles sont des antibiotiques de choix dans le traitement des infections invasives de *salmonelles* chez les enfants. Les études récentes rapportent l'émergence de *salmonelles* résistantes aux céphalosporines à spectre large. Cependant, la dissémination de telles souches peut avoir de sérieuses conséquences cliniques. [3]

La solution disponible actuellement contre le développement de la résistance antimicrobienne des salmonelles est d'utiliser des médicaments différents, souvent nouveaux, pour traiter leurs effets.

Dans ce sens, l'exploitation de nouvelles sources naturelles, à partir des résidus alimentaires frais, peut fournir une solution efficace à ce problème. La priorité est réservée aux produits qui réduisent le nombre de décès et évitent les effets secondaires et négatifs sur la santé humaine. [1]

Le chitosane est un biopolymère non toxique et non allergique, il est caractérisé par sa biocompatibilité, biodégradabilité, bioactivité [4], à côté de son activité antibactérienne, fungistatique, et anti-tumeur. [5] C'est un dérivé partiellement ou totalement désacétylé de la chitine : un polysaccharide biodégradable fournit surtout par les carapaces d'invertébrés marins. La chitine est le deuxième polymère le plus abondant dans la nature après la cellulose. [6]

Les caractéristiques physiologiques et biologiques uniques du chitosane lui offre un grand potentiel dans plusieurs industries comme agent antibactérien. [4,5] Cependant, le chitosane est bactéricide uniquement dans certaines conditions. Des études récentes ont montré que le chitosane avec un faible poids moléculaire, dans la gamme de 5 à 10 KDalton, a une meilleure activité bactéricide et biologique quand on le compare au chitosane à poids moléculaire élevé. [7-9] Cela est dû à la faible solubilité du chitosane de haut poids moléculaire dans les solutions aqueuses à pH neutre. [10]

D'autre part, grâce à la teneur élevée en azote, le chitosane a une grande capacité à réagir avec les ions métalliques par, en fonction du pH, formation de chélates ou par interactions électrostatiques. [11]

La liaison de coordination, établit entre les groupements fonctionnels du chitosane et les ions métalliques, affaiblit les liaisons qui entourent le site de coordination et cause quelques points faibles dans la chaîne du chitosane ce qui peut conduire à sa dégradation. [12]

Ces informations nous conduisent à penser que l'association des influences bactériostatiques du chitosane et du cuivre, en plus de la possibilité de la diminution du poids moléculaire du chitosane par complexation des ions de

cuivre, peut conduire à un produit encore plus puissant contre la *Salmonelle enteritidis*. Sachant que le cuivre métallique et les ions de cuivre ont une activité antibactérienne contre les bactéries les plus nuisibles [13].

L'interaction entre le chitosane et le cuivre a été largement évaluée dans la littérature en étudiant son adsorption sur le chitosane [14,15] ou la préconcentration / séparation des ions métalliques [16-18].

Le chitosane montre une affinité exceptionnelle envers le cuivre, traduite par un taux d'adsorption élevé par rapport aux autres métaux. [19]

Plusieurs travaux ont étudié la formation du complexe chitosane-Cu (II) [12,20,21], quelques études ont eu comme objectif l'évaluation de l'activité antibactérienne de ces complexes et la corrélation structure-activité antibactérienne. [22,23]

Dans le but d'étudier l'effet de la liaison de coordination, et donc la structure des complexes chitosan-Cu (II), sur l'activité antibactérienne du chitosane de haut poids moléculaire contre *S. enteritidis*, on a procédé :

-à l'extraction de la chitine à partir des carapaces des crevettes rouges (au niveau de l'ANRH, Soumaa),

-à sa conversion en chitosane, puis à la formation de sept complexes de différents rapports molaires (cuivre : unité glucosamine), de 1 : 1 ; 1 : 2 ; 1 : 3 ; 1 : 4 ; 2 : 1 ; 3 : 1 ; et 4 : 1 (au niveau du laboratoire de chimie physique moléculaire et macromoléculaire de l'université de Blida),

- et finalement à l'évaluation de leur activité antibactérienne contre *S. enteritidis* (entreprise au niveau du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida).

CHAPITRE 1

LA CHITINE ET LE CHITOSANE

1.1. Introduction :

Les biopolymères sont des composés produits dans la nature par les organismes vivants et les plantes. Ils sont éventuellement dégradés et réabsorbés dans la nature après avoir participé dans le biocycle naturel. Les biopolymères les plus connus sont l'amidon et les polysaccharides tel que la cellulose et la chitine. [24]

Les polysaccharides sont largement distribués dans la nature avec des propriétés et des structures moléculaire très variées. Ces structures ont eu, auparavant, une considération moins importante que les autres polymères naturels tels que les protéines et les acides nucléiques vu les fonctions biologiques de ces derniers.

Cependant, les polysaccharides attirent une attention de plus en plus croissante grâce à leurs activités biologiques et propriétés physicochimiques avec des structures et des caractéristiques uniques qui sont tout à fait différentes de celles des polymères synthétiques. [25]

La chitine est un aminopolysaccharide linéaire abondant dans la nature. Il est formé d'unités N-acétyl-glucosamines liées entre elles par des liens glycosidiques de type β -1,4 [4]. Sa structure est similaire à celle de la cellulose, elle a des groupements acétamides NHCO-CH_3 dans la position C2 à la place de groupements hydroxyles présents dans la cellulose (figure 1.1). [26]

Le terme chitosane (parfois dit chitosan [27]), loin de répondre à une seule et unique structure chimique bien définie, s'adresse à toute une famille de

copolymères composés de deux types de monomères (figure 1.2 [28]) : monomère N-acétyl-D-glucosamine qui est l'unité de la chitine et le monomère N-glucosamine qui est l'unité de chitosane en proportions variables [27,19].

En général, quand le nombre des unités glucosamines est moins que 60%, le biopolymère est appelé chitine. Inversement, quand le nombre des unités N-glucosamine est plus élevé que 60% le terme chitosane est utilisé. [29]

L'intérêt principal dans le chitosane dérive de sa nature cationique dans les solutions d'acides dilués, ce qui lui offre des propriétés uniques par rapport aux autres polysaccharides qui sont habituellement neutres ou négativement chargés. [19]

En plus de sa charge positive, sa non-toxicité, biocompatibilité et biodégradabilité, le chitosane est un produit de viscosité différente et facilement modifiable chimiquement [30]. Il peut être produit sous plusieurs formes : billes, flocons, poudre, pâte, film, fibre, membrane....etc. [27].

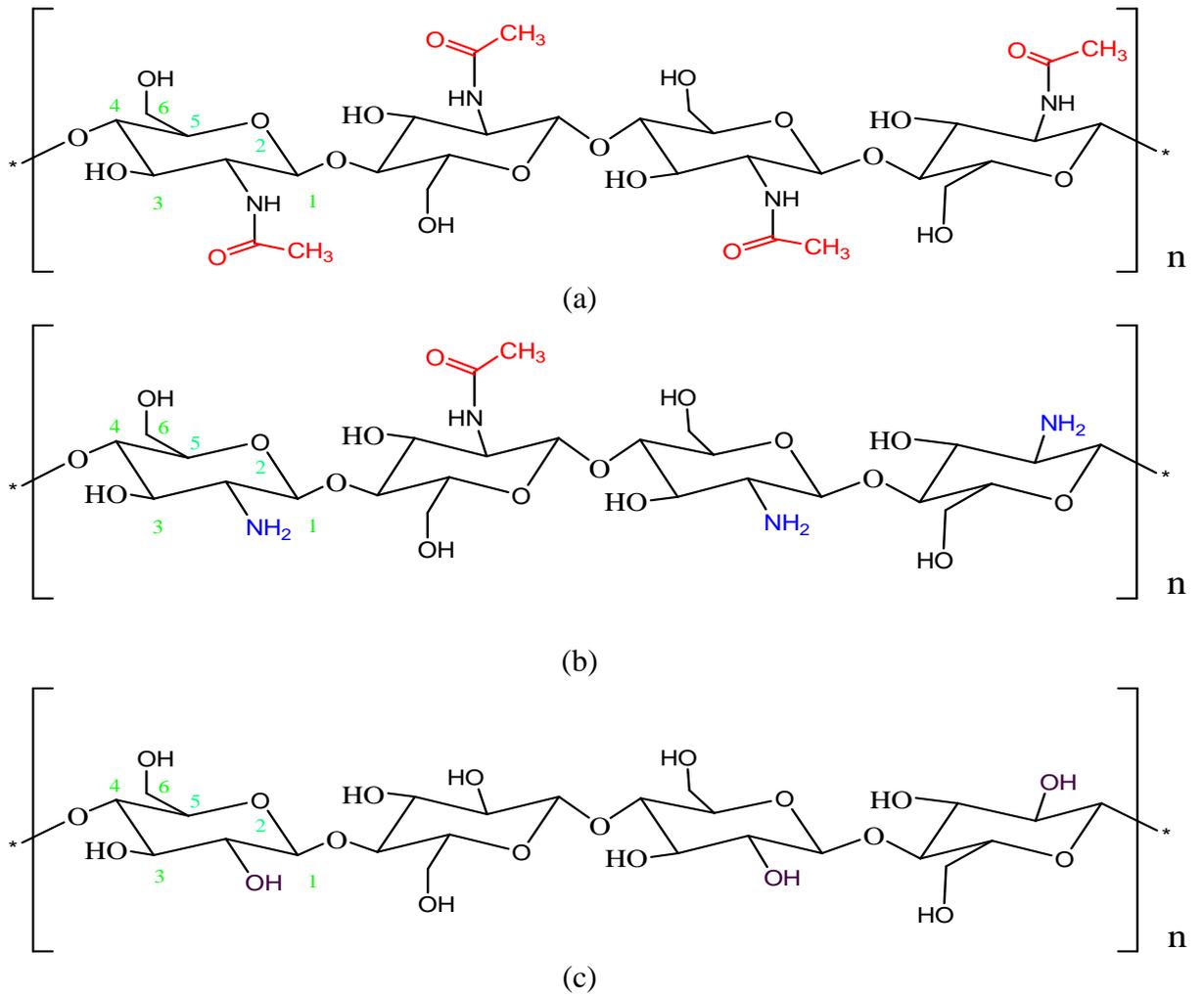


Figure 1.1 : La structure chimique de (a) la chitine, (b) le chitosane et (c) la cellulose [26]

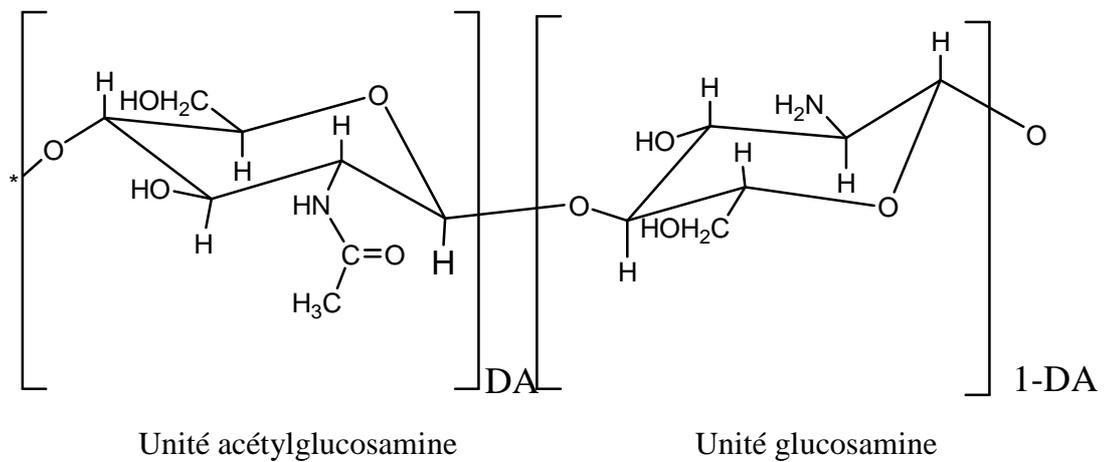


Figure 1.2 : Les deux unités présentes dans la chitine et le chitosane [56]

1.2. Histoire de la chitine et du chitosane :

En 1811, le professeur Henri Braconnot, directeur du jardin biologique à Nancy, France, isole un produit fibreux à partir de certains champignons. Il observe que cette substance n'est pas soluble dans les solutions aqueuses acides, par exemple l'acide sulfurique.

Une décennie plus tard, la même substance est trouvée dans certains insectes. Ojean (parfois dit Odier) en 1823 la nomme « Chitine » (du grec *Khithon* qui signifie enveloppe). [26]

Le chitosan est isolé et identifié pour la première fois sous le nom de « chitine modifiée » en 1859 par le professeur C. Rouget qui, après avoir soumis la chitine à un traitement alcalin sous reflux avec une solution concentrée d'hydroxyde de potassium [26,27], trouve que le produit ainsi obtenu possède des caractéristiques physico-chimiques bien différentes du polymère naturel dont il est issu. Contrairement à la chitine, ce produit est soluble dans les solutions acides. [10,26,27]

Trente-cinq ans plus tard, en 1894, Hoppe-Seyler décrit une procédure permettant d'obtenir, par chauffage à 180°C, la chitine d'origine animale (carapace de crabes, scorpions et araignées). Il trouve un produit soluble dans l'acide acétique dilué, qu'il n'identifie pas comme étant la « chitine modifiée » découverte par Rouget et crée alors le terme chitosane. [26,27]

En 1878, Ledderhose propose que la chitine se compose de glucosamine et d'acide acétique. [26]

En 1934, une procédure de fabrication de chitosane à partir de son parent naturel, la chitine, est décrite par Rigby dans un brevet. [27]

Durant les années 1930 et 1940, ces polymères de glucosamine reçoivent beaucoup d'intérêt dans l'extrême orient, principalement pour leurs applications dans les champs de médecine et dans la purification de l'eau. [26]

Depuis le milieu des années 1960, un nombre considérable des recherches sur la chitine et le chitosane proviennent de l'Asie, principalement le Japon.

Le but, à l'époque, était de mieux comprendre ce matériau et de découvrir la totalité du spectre de la recherche concernant le chitosane, à partir de la meilleure méthode de production et de purification, la dérivation chimique jusqu'à la myriade d'applications. Grâce aux applications biomédicales, les efforts de recherches sont devenus plus rationnels et concentrés dans ce domaine. C'est une conséquence de la nature spéciale des applications biomédicales de ce matériau. [10,31]

Durant les années 1970, l'intérêt de ces bio-macromolécules a été vivement renouvelé en découvrant ses propriétés adsorbantes envers les métaux [32] et en organisant la première conférence Chitine-Chitosane au Etats-Unis en 1977.

Le travail novateur de Muzzarelli pendant les années quatre vingt a fortement avancé notre compréhension de ces matières.

Actuellement, il est connu que la chitine et le chitosane (collectivement appelé les substances chitineuses) sont des sources renouvelables que l'on peut trouver en abondance dans la nature. Ce fait a attiré plus d'intérêt pour le développement de nouvelles applications de ces simples substances. [26]

1.3. Source de la chitine et du chitosane:

La chitine est produite naturellement par biosynthèse, sa production est pratiquement inépuisable. Elle se trouve naturellement dans les téguments d'insectes, de nématodes et d'invertébrés marins. On en retrouve également dans la paroi cellulaire de certaines algues et dans les parois de champignons. [6]

La principale source de chitine exploitée commercialement demeure néanmoins les carapaces d'invertébrés marins. Les arthropodes comptent plus d'un million d'espèces constituant une large source permanente de biomasse. [33,34]

Les carapaces d'invertébrés marins sont fournies en grandes quantités par l'industrie de la transformation alimentaire des crustacés. Pour ces industries, les téguments sont un véritable déchet et leur utilisation est une forme de revalorisation de la biomasse.

Les champignons utilisés par l'industrie des fermentations sont une deuxième source de chitine exploitée commercialement. La chitine est extraite des parois

des microorganismes après leur utilisation en fermenteur. Il s'agit donc d'un autre exemple de revalorisation de la biomasse. [6]

La chitine se trouve dans les carapaces des crabes, crevettes et les homards (α -chitine) avec une proportion de 14% à 35% du poids sec des carapaces. Les carapaces des crustacés bivalves tels que les palourdes et les huîtres contiennent un pourcentage de chitine relativement bas (3-6%). Cette petite quantité de chitine est liée à une haute proportion de minéraux, ce qui rend l'extraction de la chitine à partir de cette source non rentable économiquement.

Les Céphalopodes tel que les calmars et les seiches contiennent jusqu'à 40% de chitine (β -chitine) dans leurs colonnes vertébrales. L'extraction de la chitine à partir d'une telle source pure de chitine a l'avantage de ne pas exiger l'étape de déminéralisation pour éliminer le sel de calcium. Malheureusement, la colonne vertébrale du calmar ne représente que 1% de son poids total [35].

Le tableau 1.1 regroupe les principales sources de la chitine.

Tableau 1.1: Pourcentage de la chitine dans ses principales sources naturelles. [26,34]

La source	Le pourcentage de chitine
Champignon	5-20%
Les vers	20-38%
Les scorpions	30%
Les araignées	38%
Les cafards	35%
Coléoptère de l'eau	37%
Les crevettes	40%
Le ver de soie	44%
Le crabe ermite	69%
Le crabe comestible	70%

De son côté, le chitosane se retrouve naturellement en tant que composant de la paroi cellulaire interne de champignons tels que les zygomycètes, *Phycomyces blakesleeanus* et *Mucor rouxii*, dans la paroi de certaines algues vertes, et de façon temporaire dans la carapace d'arthropodes lors de leur mue. Néanmoins, la principale source du chitosane commercialisé demeure la chitine que l'on traite chimiquement par hydrolyse basique. [6,27]

Le chitosane produit par désacétylation de la chitine contient des groupements acétyles uniformément distribués le long de la chaîne du polymère. Par opposition, dans le chitosane présent dans les parois des champignons les résidus acétylés sont présents dans des clusters (groupes). [19]

La biosynthèse annuelle de la chitine d'origine marine est estimée à être de 10^9 à 10^{11} tonnes. Ce qui la positionne en deuxième place derrière la cellulose. [24,25,36]

Les principaux producteurs de la chitine et du chitosane sont le Japon (qui fournit approximativement 90% du chitosane global du marché) [37] et les USA [35, 38,39]. L'Inde, la Chine, le Pakistan, la Norvège et l'Islande, entre autres, sont de nouveaux producteurs de chitine et de chitosane. [38]

1.4. Production de la chitine et du chitosane :

Quelque soit la source de la chitine, la matière première doit être traitée dès que possible après son obtention pour limiter la dégradation microbologique et enzymatique qui réduit le rendement en chitine. [35]

Suivant la source exploitée, la chitine est produite par deux méthodes : la méthode chimique traditionnelle et les méthodes biologiques.

1.4.1. La méthode chimique traditionnelle :

L'extraction de la chitine et du chitosane en utilisant la méthode chimique traditionnelle s'effectue par une succession d'étapes chimiques.

La première étape est de broyer finement les carapaces des crevettes ou des crabes, la source principale de la chitine.

Dans la deuxième étape, les carapaces finement broyées sont traitées par une solution aqueuse de NaOH 3-5% pour éviter la contamination de la chitine par les protéines en les éliminant, c'est la déprotéinisation (DP).

Les carapaces déprotéinisées sont par la suite déminéralisées, c'est l'étape de la déminéralisation (DM). Le calcium est éliminé en traitant les carapaces déprotéinisées par une solution aqueuse d'HCl 3-5%. Le produit légèrement rose obtenu est la chitine [10,40].

Les pigments caroténoïdes sont extraits par certains solvants tels que l'huile comestible à 60°C [35], l'acétone [41] ou le propan ol [42].

Pour obtenir le chitosane, la chitine est traitée par une solution aqueuse de NaOH 40-45% à haute température. C'est la désacétylation (DSA). Le processus de désacétylation implique l'élimination des groupements acétyles de la chaîne moléculaire de la chitine en laissant des groupements amines à leurs places. [10,38]

La désacétylation homogène implique le traitement sous vide de la chitine par une solution de NaOH. Cela a pour but de dégager l'air présent entre les particules de la chitine et pour accélérer et assurer la diffusion homogène du NaOH.

Cette condition produit une homogénéité de désacétylation (distribution des groupements amines) dans le chitosane [43].

En fonction de l'origine et du processus de fabrication, le chitosane obtenu peut avoir des propriétés et des compositions différentes. [24,44]

La production de la chitine et du chitosane en utilisant la méthode chimique traditionnelle est schématisée dans la figure 1.3. [26]

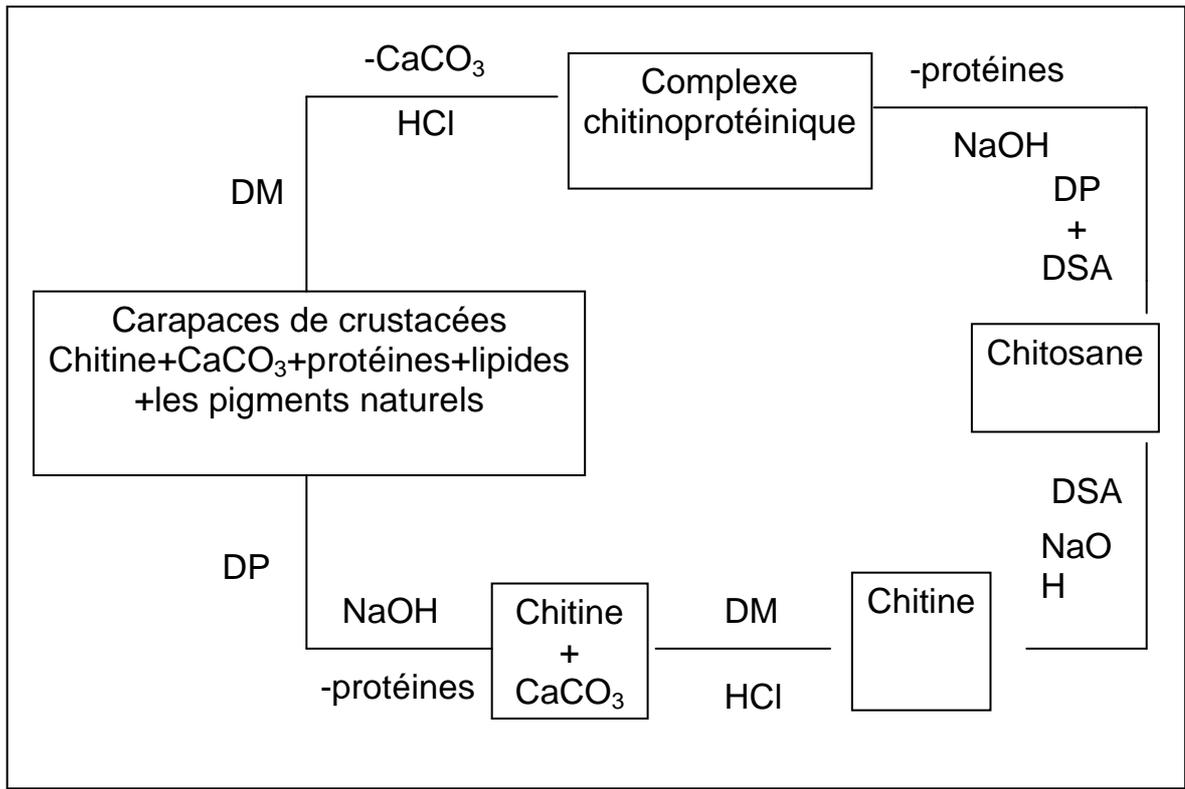


Figure 1.3 : Schémas des principales étapes d'extraction de la chitine et sa conversion en chitosane [26]

1.4.2. Les méthodes biologiques :

De nouvelles méthodes biologiques pour extraire la chitine ont été mises au point. Ces méthodes produisent une chitine dans des conditions opératoires plus douces et avec des caractéristiques plus compatibles que ceux de la chitine produite par la méthode traditionnelle.

Ces nouvelles méthodes sont réalisées par voie enzymatique en cultivant des bactéries protéolytiques sur les surfaces des carapaces pour la dégradation des protéines.

Parmi une série d'enzymes testés, la chymotrypsine s'est avéré être la plus efficace pour accomplir un degré de déprotéinisation semblable à celui de la méthode chimique. [35]

La fermentation avec l'acide lactique peut être aussi utilisée comme méthode biologique d'extraction de la chitine [6]. C'est un processus de

fermentation contrôlé dans lequel l'acide lactique produit va dissoudre les carbonates de calcium contenu dans les carapaces. Une matière liquide est produite à partir de laquelle les protéines, la chitine, et les pigments sont obtenus.

Le chitosane peut être préparé biologiquement à partir de la chitine en utilisant des méthodes enzymatiques ou la fermentation.

1.5. Facteurs affectant la production du chitosane:

1.5.1. Effet des conditions de traitement lors de l'isolation de la chitine:

W. A. Bough et al [45] ont produit dix chitosanes à partir des carapaces des crevettes en utilisant différentes conditions opératoires. Les conditions testés sont : la déprotéinisation alcaline contre la déprotéinisation enzymatique, la déminéralisation acide contre aucun traitement.

La déprotéinisation alcaline ou enzymatique n'a pas affecté le contenu du chitosane en azote, cependant, la viscosité du chitosane obtenu par hydrolyse enzymatique est réduite.

Quelques différences de viscosité sont observées entre les produits déminéralisés et les produits non déminéralisés, une différence importante dans la distribution du poids moléculaire dans ces produits est évidente.

La fermentation avec l'acide lactique est utilisée pour l'extraction de la chitine des crevettes roses. Ce processus élimine 690 g.kg^{-1} de matière inorganique, 490 g.kg^{-1} de protéine et 540 g.kg^{-1} de lipides à l'échelle du laboratoire.

Les propriétés fonctionnelles de la chitine, le poids moléculaire et le degré de désacétylation du chitosane sont similaires à ceux de la chitine et du chitosane obtenus chimiquement. [45]

En dépit de l'extraction incomplète de la chitine, ce processus biologique d'extraction de la chitine peut être utilisé pour produire de la chitine et du chitosane dans des conditions qui respectent la protection de l'environnement. [46]

1.5.2. Effet du processus de désacétylation :

Dans le but d'étudier l'effet du processus de désacétylation sur les propriétés du chitosane, A. Tolaimate et al [33] ont converti la chitine en chitosane suivant deux procédés.

Dans le premier (procédé de Broussignac, KOH alcoolique) ils ont utilisé un mélange d'hydroxyde de potassium solide (KOH) (50%), éthanol 90% (25%) et le monoéthylène glycol (25%), qui est un milieu de réaction presque anhydre.

L'autre méthode de désacétylation (procédé de Kurita, NaOH aqueux) consiste à mettre la chitine dans une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) (50% poids / volume) sous azote et sous agitation.

Le borohydrure de sodium NaBH_4 et le thiophénol sont ajoutés au milieu réactionnel pour éviter la dégradation du polymère.

Dans le cas de β -chitine des calmars, en comparaison avec le procédé de Broussignac, le procédé de Kurita a conduit à un chitosane de poids moléculaire élevé et de degré de désacétylation élevé sous des conditions de réaction modérées (NaOH 40%, T 80°C).

Cependant, quand la α - chitine des carapaces de crustacés est désacétylée, l'effet inverse est observé. Le procédé de Broussignac présente l'avantage d'avoir du chitosane de meilleur qualité (un poids moléculaire élevé et un degré de désacétylation élevé) en une seule étape d'une courte durée (2h pour les crevettes et 7-8 h pour les crabes araignées). [33]

1.5.3. Effet de l'ajout d'additifs dans le milieu réactionnel :

Les données fournies par la littérature montrent que l'ajout du borohydrure de sodium (NaBH_4), un agent réducteur [47], au milieu réactionnel évite l'oxydation du produit et assure une action protectrice contre la dégradation de la chaîne polymérique. [33,48]

Quand la réaction de désacétylation est réalisée en présence de NaBH_4 , le chitosane obtenu à partir de l' α -chitine (crevette) ou β -chitine (calmars) est différent de celui préparé sans NaBH_4 par sa couleur blanche et son poids moléculaire élevé. [49]

Le thiophénol, qui n'est pas un agent réducteur, est mentionné comme étant efficace pour minimiser la dégradation du polymère durant la désacétylation avec une solution aqueuse de NaOH . [33,50]

La désacétylation menée sans aucun additif produit un chitosane qui est légèrement plus désacétylé mais avec une sévère dépolymérisation. [47]

1.5.4. Effet de l'atmosphère :

L'opération sous un gaz inerte (azote ou argon) durant la réaction de désacétylation résulte en un chitosane plus cristallin [49] ayant une viscosité élevée que celui préparé sous air atmosphérique. Ce qui n'est pas toujours désirable. Elle permet de réduire la modification du poids moléculaire causé par les mécanismes d'oxydation lors de l'opération sous air [51]. L'effet dégradatif de l'air est beaucoup plus prononcé pour les carapaces de taille de 1mm. [45]

1.5.5. Effet de la concentration de NaOH , le temps et la température de la désacétylation :

C-H. Chen et al [52] ont étudié l'effet de la température, le temps de désacétylation, et de la concentration de NaOH sur le degré de désacétylation (DD) du chitosane.

Les résultats ont montrés que la valeur du DD augmente avec l'augmentation de la concentration de NaOH , le temps et la température de la désacétylation.

U. Chinadit et al [53] ont étudié l'effet des conditions de désacétylation sur le chitosane produit. Ils ont utilisé une solution de NaOH 50% à plusieurs hautes

températures 70°C, 80°C et 90°C pendant 3 à 5 h et même à température ambiante pour 3 à 7 jours.

Ils ont trouvé qu'à température élevée, le chitosane produit est obtenu avec un degré de désacétylation entre 66.23% et 87.6%.

Pour le traitement à température ambiante pendant 3 jours, le chitosane produit est obtenu avec un degré de désacétylation entre 72.00% et 73.00%. [53]

1.5.6. Effet de la provenance :

La source influe sur le poids moléculaire viscosimétrique du chitosane, sur l'évolution de la réaction de désacétylation de la chitine et sur le degré de désacétylation du chitosane produit.

Des chitines de différentes sources ont été soumises, par A. Tolaimate et al [33], à des réactions de désacétylation suivant le processus de Broussignac.

La durée minimale nécessaire pour obtenir un produit soluble dans l'acide acétique 5% dépend de la source de la chitine employée.

Un temps de réaction de 1h est suffisant dans le cas de β -chitine des calmars.

Dans le cas de α -chitine le temps minimal est autour de 3 à 4 h pour la chitine des crevettes roses et des seiches.

Pour les homards, les crabes rouges, et les crabes araignées le produit soluble dans l'acide acétique 5% n'est obtenu qu'à partir de 6 ou 7 h de traitement.

1.6. Les propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane :

La chitine est un matériau blanc, dur avec une structure inélastique de poids moléculaire élevé [10], de stoechiométrie $(C_8H_{13}NO_5)_n$, elle contient 6.9% d'azote [41]. La chitine brute extraite à partir de ses sources naturelles contient environs 10% de groupes amines libres. [54]

Le chitosane est un amine primaire de stoechiométrie $(C_6H_{11}NO_4)_n$, il contient 8.7% d'azote. [41]

Les principaux paramètres caractéristiques de la chitine et de son dérivé le chitosane sont la fraction désacétylée, le poids moléculaire, la cristallinité et la

solubilité. Ces paramètres influent les propriétés physico-chimiques du chitosane et peuvent être ajustés selon l'application pour laquelle il est préparé. [55]

1.6.1. Le degré de désacétylation (DD) :

1.6.1.1. Définition :

Le chitosane et la chitine sont tout les deux des copolymères de même structure chimique globale et ne se distinguent que par la proportion relative des unités acétyl glucosamine et glucosamine les constituant. Le degré d'acétylation (DA) est définie comme étant la fraction molaire des unités acétylées (unité acétyl glucosamine). Le degré de désacétylation (DD) est définie comme étant la fraction molaire des unités désacétylées (unité glucosamine). [43]

DA et DD sont relié par l'équation (1) [28] :

$$DD=1-DA \quad (\text{eq 1.1})$$

Ce paramètre influe sur toutes les propriétés physico-chimiques (poids moléculaire, viscosité, solubilité...) du chitosane et apparaît donc comme le plus important paramètre puisqu'il peut influé la performance du chitosane dans ces applications. [35 37,38]

Le degré de désacétylation peut être augmenté en utilisant des additifs ou en opérant sous azote ou argon. [57]

1.6.1.2. Détermination du degré de désacétylation :

La détermination du DD est devenu l'une des analyses de routine lors de l'extraction de la chitine et la préparation du chitosane. [38, 58]

Une telle méthode doit être rapide, précise et de préférence ne nécessite aucune courbe d'étalonnage obtenu par d'autres méthodes et ne fait appel à aucune solution étalon de DD connu. [58,59,60]

Plusieurs méthodes ont été proposées tel que le titrage potentiométrique (ou volumétrique), la spectrométrie infrarouge (IR), la spectrophotométrie ultraviolet -visible (UV-VIS), l'analyse élémentaire, et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Malheureusement, ces techniques montrent souvent des contradictions considérables dans les valeurs obtenues de DD. [58]

Le DD ne peut pas être déterminé uniquement par l'une des méthodes qui exige la masse exacte de l'échantillon, tel que la première dérivée du spectre UV, principalement à cause de l'interférence causé par les impuretés présentes dans l'échantillon.

Ces méthodes, qui ne sont valables que pour des échantillons bien purifiés, peuvent être employées avec le recours à d'autres méthodes plus précises tel que la RMN du proton. [43]

1.6.1.2.1. Détermination du DD par la RMN du proton:

Toutes les techniques à l'exception de la RMN, exigent le poids exact du chitosane. Par conséquent, l'humidité doit être éliminée avec soin et la pureté des échantillons doit être déterminée séparément. Beaucoup de techniques non RMN sont inexactes, longues ou compliquées.

Par conséquent, ce n'est pas surprenant que la RMN du proton soit reconnu comme une méthode de choix pour la détermination du DD de chitosane puisqu'elle ne nécessite pas l'étalonnage de l'appareil.

Dans la méthode RMN, il n'est pas nécessaire de connaître exactement la quantité de chitosane utilisée et la pureté de l'échantillon ne doit pas être forcément déterminée puisque le pic de l'impureté ne chevauche pas avec ceux utilisés dans la détermination du DD. [58]

Cette technique s'est avéré être précise et exacte pour la quantification des produits de haut DD [58,59] qui est toujours difficile à déterminer avec les méthodes conventionnelles tel que la spectrométrie infrarouge à transformée de

Fourier (IRTF) ou le titrage potentiométrique [58]. Ce qui lui a permis d'être utilisée à l'échelle industrielle. [59]

L'importance de la RMN du proton dans la détermination du DD de chitosane est aussi démontrée par le fait que la valeur du DD donnée par cette méthode est une valeur de référence pour les autres méthodes. [59]

La méthode RMN du proton en phase liquide est une méthode logique puisque le DD peut être déterminé en utilisant différentes combinaisons de pics, elle n'est limitée que par le taux de solubilité du chitosane qui dépend du DD et de son poids moléculaire. [58, 61]

1.6.1.2.2. Détermination du DD par RMN de l'état solide (RMN du ^{13}C):

Parmi les techniques proposées pour la détermination du DD, la RMN du ^{13}C est l'une des plus puissantes techniques qui permet une détermination directe du DD des produits solubles et insolubles et n'exige aucune préparation spécifique de l'échantillon. [52,62]

A présent, la spectrométrie RMN du ^{13}C à l'état solide n'est pas encore largement disponible dans la plupart de laboratoires. Les résultats obtenus par cette technique sur les échantillons sélectionnés peuvent être utilisées pour étalonner des techniques moins chères et plus disponibles tel que la spectrométrie IRTF. [62]

1.6.1.2.3. Détermination du DD par IRTF :

La spectrométrie IR est la technique la plus répandue dans la détermination du DD. [57,63]

Cette méthode est assez rapide, elle est utilisée pour du chitosane à l'état solide (on a pas à dissoudre l'échantillon) sous forme de pastille de KBr [58], ou pour plus de précision sous forme de film. [64]

Pendant les deux dernières décennies, des améliorations dans la technique IR ont été proposés en faisant appel à d'autres bandes d'absorption et /ou de nouvelles lignes de base pour la détermination du DD.

L'utilisation de la bande amide I (1655cm^{-1}) combinée à celle des groupements hydroxyles (3450cm^{-1}) comme une référence semble avoir les meilleurs résultats. [24,58]

Des équations empiriques pour calculer le DD du chitosane en utilisant ces deux bandes avec différentes lignes de bases ont été proposées (tableau 1.2).

Tableau 1. 2 : Les formules utilisées dans la détermination du DD du chitosane

La formule	référence
$DD=97.67-[26.486 (A_{1655}/A_{3450})]$	I. S. Lima et al [57]
$DA= (A_{1655}/A_{3450}) \times 115$	W. L. Teng et al [65]
$DD= 100 \times (1-(A_{1655}/A_{3450})/1.33)$	Y. Zhang et al [43] K. V. Harish Prashanth et al [50] A.B. Vishu Kumara et al [66]
$DD=87.8-[3(A_{1655}/A_{3450})]$	M. Fernandez Cerveraa et al [67]
$A_{1320}/A_{1420} = 0.3822+0.03133 \times DA$	N. Q. Hien et al [68]

1.6.1.2.4. Détermination du DD par titrage potentiométrique :

La détermination du DD par titrage potentiométrique est l'une des méthodes les plus simples pour la détermination du DD [69]. Les équipements et

les réactifs demandés sont aisément disponibles dans n'importe quel laboratoire de chimie.

Dans cette méthode, le chitosane est dissous dans une solution diluée d'acide chlorhydrique et titré potentiométriquement par une solution d'hydroxyde de sodium [33,69], de préférence sous azote pour éviter la dégradation du polymère. [70]

Le titrage résulte en une courbe de titrage de deux points d'inflexion. Le premier et le deuxième point d'inflexion, notés 1 et 2 (figure 1.4), sont des points d'équivalence du titrage de l'acide hydrochlorique en excès et le titrage du chitosane protoné, respectivement.

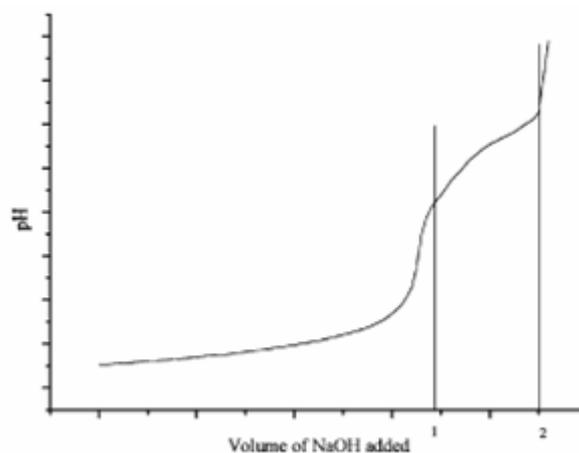


Figure 1.4 : La courbe de titrage dans la méthode de Broussignac [69]

La différence entre les deux points d'inflexion le long de l'abscisse correspond à la quantité d'acide consommée pour la protonation des groupements amines du chitosane. [33,69,70,71,72]

1.6.1.2.5. Détermination du DD par analyse élémentaire :

L'analyse élémentaire est une technique très employée pour la détermination du DD. Deux formules sont disponibles dans la littérature pour ce but :

$$DD = \left(1 - \frac{C/N - 5.145}{6.816 - 5.145}\right) \times 100 \quad (\text{eq 1.2})$$

Où C/N est le rapport entre les pourcentages en carbone et en azote [69]

$$DA (\%) = [(8,695 - \%N) / 1,799] \times 100 \quad (\text{eq 1.3})$$

Où 8.695 est le pourcentage d'azote dans le chitosane complètement désacétylé. 1.799 est la différence entre 8.695 et 6.896 qui est le pourcentage d'azote dans la chitine complètement acétylée. [73,74]

1.6.1.2.6. Détermination du DD par la diffraction des rayons X (DRX) :

La détermination du DD par la diffraction des rayons X des poudres (méthode de l'indice de cristallinité (ICr₀₂₀)) présente plusieurs avantages dont le plus important est la non destruction du produit.

Les traces d'impuretés tel que NaOH et NaCl présentent dans l'échantillon ne peuvent pas interférer avec la détermination du DD puisque, généralement, l'impureté ne peut pas être détecté par la DRX si elle ne dépasse pas 3% du poids total.

Y. Zhang et al [43] ont évalué la relation entre l'état cristallin du chitosane et son DD en analysant les diffractogrammes DRX de plusieurs chitosanes. En étudiant la variation de l'indice de cristallinité (ICr) en fonction du DD, les auteurs ont trouvé que ICr diminue linéairement avec l'augmentation du DD. Cette relation linéaire entre ICr et DD suggère la possibilité de la détermination du DD des macromolécules tel que la chitine et le chitosane par DRX.

1.6.2. La viscosité et le poids moléculaire :

La chitine et le chitosane représentent une longue chaîne ayant une masse moléculaire supérieur à plusieurs millions de Dalton [27,75] entre 1.03×10^6 et 2.5×10^6 Da.

La réaction de désacétylation est responsable de la réduction du poids moléculaire du chitosane entre 1×10^5 et 5×10^5 [5] (entre 1.5×10^5 et 6×10^5 [26]).

La viscosimétrie capillaire est la technique la plus utilisée pour la détermination du poids moléculaire du chitosane. Elle est très simple : le temps que prend une solution de polymère avec un certain volume pour passer à travers un capillaire fin est comparé au temps de passage du solvant à travers le même capillaire. Les deux temps de reflux (t_{solution} et t_{solvant}) sont proportionnels à la viscosité (η_{solution} et η_{solvant}), et inversement proportionnels à la densité. [76]

La viscosité relative (η_{rel}) est un simple rapport des temps d'écoulement :

$$\eta_{\text{rel}} = \eta_{\text{solution}} / \eta_{\text{solvant}} = t_{\text{solution}} / t_{\text{solvant}} \quad (\text{eq 1.4})$$

On définit aussi la "viscosité spécifique (η_{sp})" comme étant le changement fractionnel de la viscosité lors de l'ajout du polymère.

La viscosité réduite (η_{red}) est la variation de viscosité spécifique par unité de concentration du polymère.

Elle est définie par l'équation :

$$\eta_{\text{red}} = \eta_{\text{sp}} / C \quad (\text{eq 1.5})$$

η_{rel} et η_{red} sont dépendantes de la concentration du polymère, donc pour extraire les propriétés intrinsèques de la chaîne du polymère, ces deux fonctions doivent être extrapolées à zéro. Quand la concentration du polymère est donnée en g/dl, la viscosité intrinsèque $[\eta]$ sera donnée en dl/g.

Le poids moléculaire du polymère est calculé par l'équation de Mark-Houwink

$$[\eta] = KM^a \quad (\text{eq 1.6})$$

Avec: K et a sont les constantes de Mark-Houwink (MH), elles sont inversement reliées et influencées par le DD, le pH, et la force ionique du solvant. [77]

L'exposant a est une fonction de la géométrie du polymère.

Dans un bon solvant, la molécule est mieux dissoute et la viscosité intrinsèque est élevée, la constante « a » est proche de 0.75 ou plus dans un bon solvant. Dans un faible solvant la solution du polymère a une faible viscosité intrinsèque et la constante « a » est proche de la valeur 0.5. [78,79]

Tableau 1.3 : Les constantes de Mark-Houwink pour différents solvants

solvant	K (ml/g)	a	Type de viscosimètre	références
NaCl 0.1M à 25 ± 0.1°C	1.75×10^{-5}	0.98	Ostwald	[80]
0.1M HOAC-0.2 M NaCl à 25 ± 0.1°C	1.81×10^{-3}	0.93	Ubbelohde	[51,67,81]
0.1M HOAC-0.2 M NaCl à 25 ± 0.1°C	1.424×10^{-3}	0.96	/	[82,83]
NaCl 0.1M à 30°C	7.92×10^{-5}	1.00	/	[84]
0.1M HOAC-0.2M NaAC à 25± 0.1°C	1.68×10^{-3}	0.96	/	[85]
0.2M HOAC 0.1M NaAC à 30 ± 0.5°C	1.64×10^{-30} $\times DD^{14}$	$-1.02 \times 10^{-2} \times$ DD + 1.82	Ubbelohde	[7,86,87]
0.5M HOAC-0.2M NaAC à 25±0.1°C	3.5×10^{-4}	0.76	Ostwald	[50,66]
0.3M HOAC-0.2M NaAC à 25± 0.1°C	0.078	0.76	Ostwald	[80]

1.6.3. La solubilité :

La chitine est hautement hydrophobique et insoluble dans l'eau, les acides, les bases et plusieurs solvants organiques [10], même avec une composition en groupements acétyles de 50%.

La chitine a des liaisons d'hydrogènes régulières, pour la dissoudre un solvant qui renforce la répulsion interchaîne ou détruit les liaisons d'hydrogènes intermoléculaires [44] tel que l'hexafluoroisopropanol, l'hexafluoroacétone, et les chloroalcools [26] est exigé.

La substance chitineuse est, habituellement, appelée chitosane lorsqu'elle est soluble dans les solutions acides, ce qui correspond à un degré de désacétylation supérieur à 60%. [55]

Le chitosane, étant un polyélectrolyte cationique de pK_a entre 6.2 et 7 (en fonction du degré de désacétylation) [24,36], à pH neutre ou basique contient des groupements amines libres d'où il est insoluble dans l'eau [19, 89,90]. Les groupements amines protonés dans les solutions d'acides diluées (pH<6 [5,30,89], pH < 6.5 [24,57]) facilitent la dissolution de la molécule [5,30,89].

Tandis que les fortes liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires, qui peuvent être formées par les groupements amines à la position C2 et les groupements hydroxyles sur C3 et C6, conduisent à la réticulation du chitosane par lui-même [19,91], et par conséquence à une très faible solubilité du produit (uniquement soluble dans les solvants protonés). [25,92,93]

Une solution aqueuse d'acide acétique 1-3% est souvent utilisée pour la dissolution du chitosane. [30]

1.6.4. La cristallinité :

L'origine de la chitine influe sur l'arrangement de la chaîne du polymère. Trois types de polymorphes de chitine ont été identifiés. Ce sont α -chitine (les carapaces de crevettes et de crabes), β -chitine (à partir des calmars), et γ -chitine (cuticules abdominales de céphalopodes), elle correspondent aux arrangements des chaînes, respectivement, parallèles, antiparallèles et alternatives. [25, 43,55]

La forme la plus abondante et la plus stable est l' α - chitine. Elle dispose de deux chaînes avec des mailles cristallines de symétrie $P2_12_12_1$ indiquant de fortes liaisons hydrogènes intermoléculaires. [43,94]

La β -chitine a une symétrie de $P2_1$, la γ -chitine a été identifié par Rudall et elle n'a pas été encore l'objet d'études détaillées comme dans le cas des formes α - et β -, et encore, elle n'est pas encore reconnu comme étant une troisième structure de la chitine. [94]

Les molécules d'eau sont présentes dans la structure de la chitine et du chitosane, elles stabilisent la structure du cristal. [95]

Suivant l'origine du chitosane et son traitement durant l'extraction à partir de la source mère, la cristallinité résiduelle peut varier considérablement. La cristallinité contrôle l'hydratation du polymère, ce qui détermine l'accessibilité aux sites internes. Ce paramètre influe fortement la cinétique de l'hydratation et la sorption. [28]

Les plus importantes modifications dans la cristallinité du polymère sont observées comme un résultat des interactions du chitosane avec les ions métalliques ou avec les acides. [55,96]

1.7. Applications du chitosane :

Les applications de la chitine sont limitées en comparaison avec le chitosane. La chitine est chimiquement inerte et insoluble dans l'eau et les solutions acides, tandis que le chitosane est relativement réactif et peut être produit sous différentes formes (billes, flocons ou membrane). [5,24,30] Les groupements fonctionnels du chitosane lui offrent de nombreuses caractéristiques physiologiques et biologiques uniques avec un grand potentiel d'applications dans plusieurs industries. [1]

Les premières applications ont été développées dans les domaines où le chitosane présentait un grand intérêt notamment en pharmacologie, cosmétologie et surtout en médecine. Ce n'est que plus tard, avec la prise de conscience de la nécessité de maîtriser les rejets polluants, que les premières études concernant les propriétés du chitosane à fixer les métaux lourds ont été entreprises. [97]

1.7.1. Applications médicales :

Le chitosane est biocompatible avec les tissus vivants, donc il ne cause pas des réactions allergiques et de rejet. Il se décompose lentement en produits inoffensifs (sucres aminés) qui sont complètement absorbés par le corps humain [30].

Le chitosane n'est pas toxique et possède des propriétés antibactériennes remarquables, il s'élimine facilement de l'organisme sans causer des réactions latérales concourantes [30]. Grâce à sa charge positive à pH physiologique, le chitosane est adhésif ce qui augmente sa rétention dans le site d'application [19,27]. Le chitosane hautement désacétylé est généralement réservé aux applications biomédicales. [55]

Les propriétés biologiques du chitosane, tel que sa non toxicité, la biocompatibilité et la biodégradabilité [19,98] confèrent à ce polysaccharide un attrait particulier pour la mise au point de systèmes à libération contrôlée, particulièrement dans la livraison des macromolécules délicates.

C'est en tant qu'excipient pour la fabrication de formes orales solides que le chitosane a tout d'abord retenu l'attention. Dans cette application, il a principalement été utilisé comme excipient pour compression directe, combinant des qualités de liant, lubrifiant et désagrégant avec la capacité d'améliorer l'écoulement de diluants conventionnels (lactose, mannitol, etc.). Son intérêt est d'autant plus grand dans le cas de la fabrication de comprimés contenant des principes actifs de type anti-inflammatoires non-stéroïdiens. Il est capable de contrecarrer leur effet indésirable le plus fréquent, à savoir irritation de la muqueuse gastrique, de par ses propriétés antiacide et antiulcéreuse.

L'utilisation du chitosane pour la mise au point de formes orales a été étendue à la fabrication et à l'étude de systèmes microparticulaires. La plupart des auteurs sont parvenus à une libération prolongée et contrôlée des principes actifs incorporés [99].

Les propriétés recherchées chez le chitosane sont non seulement celle d'un véhicule susceptible de prolonger la libération du principe actif tout en réduisant sa toxicité mais aussi celle d'un agent décrit comme lui-même doué d'une activité antitumorale.

L'applicabilité et l'intérêt du chitosane pour le développement de préparations destinées à une administration par voie nasale, ophtalmique ou transdermique ont été développés. [27]

A coté de son inclusion dans les pansements pour réduire l'inflammation et la guérison des blessures, le chitosane purifié est utilisé dans le traitement d'hypocholestérolémie pour réduire le niveau du cholestérol dans le sang et dans le foie [35,100]. Il est aussi utilisé comme agent coagulant du sang pendant la chirurgie vasculaire et dans la protection dentaire pour prévenir la formation de la plaque bactérienne. [35]

De nombreuses études ont démontré que les chitosanes et leurs dérivés se sont avérés sûrs et efficaces pour améliorer l'absorption au niveau des muqueuses des macromolécules hydrophiles telles que des peptides et des protéines. [101]

Le peu d'applications médicales du chitosane qui ne sont pas permises dû à sa faible force mécanique, peuvent être accomplies par le chitosane cristallin dérivé des tendons des crabes qui a une force mécanique suffisante pour des utilisations orthopédiques. [102]

1.7.2. Traitement des eaux :

Le traitement des eaux usées (éliminer les métaux lourds, pesticides et les teintures [35,90,103]) et le traitement du sol [104] sont l'une des applications courantes des formulations à base de chitine/chitosane.

Cela est dû aux propriétés de coagulation, floculation et de chélation du chitosane provenant de la haute densité des groupements amines sur sa chaîne polymérique.

Le chitosane réagit, et donc élimine, les contaminants de l'eau tel que les solides en suspension dans les rejets de l'industrie alimentaire et les teintures dans les effluents de textile.

Les produits persistants hautement toxiques trouvés dans les rejets de l'industrie de plastique, d'électricité et de lubrifiants, peuvent être éliminés respectivement par les mécanismes de coagulation/floculation et adsorption [90].

D'autres contaminants dangereux, tels que les phénols trouvés dans les rejets de l'industrie du papier et de pulpe, peuvent être éliminés en leur convertissant en o-quinone par l'enzyme tyrosinase puis ultérieurement par réaction avec les groupements amines du chitosane. [90]

Le chitosane est utilisé comme agent coagulant pour éliminer les protéines. Il a l'avantage, par rapport aux agents chimiques de floculation traditionnelle, d'être non-toxique et donc la matrice organique rejetée peut être utilisée comme aliment des animaux. [35]

La décharge des métaux lourds dans les systèmes aquatiques est devenu une préoccupation mondiale. Ces polluants sont introduits dans les systèmes aquatiques comme rejets de plusieurs opérations industrielles.

Les métaux lourds tel que le plomb, le zinc, et le chrome ont un nombre important d'applications dans les travaux de l'acier, pulpe et papier, l'industrie de cuir, la pétrochimie, les engrais ...etc.

La pollution causé par le plomb est principalement due aux automobiles et la fabrication des batteries. Pour le zinc et le chrome, leurs applications majeures sont dans les engrais et le tannage du cuir, respectivement. [105]

Plusieurs technologies ont été développées au cours des dernières années pour l'élimination des ions métalliques toxiques de l'eau.

Les plus importantes sont la filtration, la précipitation chimique, l'échange d'ions et l'adsorption, l'électro-déposition, les membranes, [106] et l'extraction par solvant. [105]

Toutes ces technologies ont des avantages et des limitations tel que la consommation d'énergie et de réactifs qui sont des polluants toxiques et doivent être éliminés à leur tour à coté de l'élimination non complète des métaux. [90,105]

L'échange d'ion par chélation est une technique qui a été étudiée au niveau du laboratoire mais pas trop appliquée à l'échelle industrielle. Par opposition à l'échange d'ions simples, l'échange d'ions par chélation prend l'avantage de former des molécules de structure de trois dimensions pour éliminer des ions métalliques de taille spécifique en présence d'une large quantité d'autres ions. [106]

Les biopolymères sont retenus parmi les meilleurs matériaux chélateurs [32, 63,105,106]. Le charbon actif est très utilisé dans ce domaine, cependant, il est généralement utilisé en conjugaison avec la précipitation chimique, la filtration,

et l'échange d'ions. Ce processus est trop cher et il n'est pas efficace pour quelques métaux. Donc, il est indispensable de chercher d'autres biosorbants qui soient moins cher et plus efficace. [32]

Le chitosane est un agent chélateur très puissant, il a acquis une véritable importance pendant les dernières années grâce à la haute performance, le faible coût, et son affinité naturelle envers les éléments métalliques [105] avec une capacité de se lier aux ions métalliques qui dépasse de loin celle du charbon actif. [24]

Le chitosane est industriellement attractif puisqu'il est capable de diminuer la concentration des ions métalliques de transition au dessous du ppb, largement disponible et ne causent pas de problèmes écologiques. [32]

En plus de l'utilisation du chitosane sous forme de flocons, les dérivés du chitosane ont été utilisés dans le développement de nouvelles résines pour la préconcentration des ions métalliques par analyse en flux continu.

A. Otavio Martins et al [70] ont synthétisé du chitosane fonctionnalisé par 8-hydroxyquinoline (oxine). Dans une autre étude [107], ils ont préparé une résine de chitosane de type éthylénediamine. R. K. Katarina et al [108] ont proposé la résine de chitosan sulphoxine et A. A. Atia [109] a préparé des résines chitosane / amine et chitosane / azole.

CHAPITRE 2

LES COMPLEXES METALLIQUES DU CHITOSANE

2.1. L'interaction chitosane-ion métallique :

Le chitosane dans son interaction avec les cations métalliques est plus réactif que la chitine. Il présente une meilleure interaction avec les cations multivalents, spécialement les cations bivalents. Les propriétés de chélation du chitosane sont liées à :

- 1- La présence d'un nombre de groupements amines primaires avec leur doublet électronique libre, réagissant en tant que des sites de bases fortes donneurs d'électrons. [28]
- 2- La haute hydrophilicité du chitosane vue le grand nombre des groupements hydroxyles [55,106]
- 3- La structure flexible de la chaîne du polymère, ce qui favorise la configuration la plus favorable du chitosane pour la formation du complexe. [57,106]
- 4- L'hétérogénéité du polymère grâce à la présence des unités acétylglucosamine et glucosamine. [55]
- 5- La contribution des groupements hydroxyles (spécialement ceux à la position C3 dans la compléxation des ions métalliques. [55]

L'adsorption des cations métalliques a lieu à pH proche de la neutralité ou faiblement acide [28,55]. La désorption a lieu par contact avec les solutions basiques, bien que des agents complexants peuvent être utilisés. [55]

La compléxation des cations métalliques est gouvernée par le pH : la compétition des protons réduit radicalement la compléxation des cations en dessous du pH 4 - 4.5. [28]

H. Zhang et S. Schiewer [63] ont démontré que la capacité de complexation du chitosane augmente avec l'augmentation du DD entre 10% et 80% à cause de

l'augmentation du contenu en groupements amine et la réduction de la cristallinité. Cependant, quand le DD atteint 90% ou plus, la capacité de sorption diminue dû à la re-cristallisation du chitosane. [63]

2.2. L'affinité du chitosane envers les métaux :

Il est intéressant de noter que le chitosane a une affinité limitée envers les métaux alcalins et alcalino-terreux dû à l'absence des orbitales d et f insaturés (contrairement aux métaux de transition). Par conséquent, le chitosane est sélectif envers les métaux de transition. [55,96]

L'affinité du chitosane envers les métaux a été largement étudiée, elle est influée par le pH et la force ionique de la solution et la compétition des autres ions. [24]. Les séries d'affinité les plus fréquentes sont : [111]

Cu(II) >Ni(II) >Zn(II) >Co(II) >Fe(II) >Mn(II) (série 1)

Hg (II) >Cu (II) >Fe(II) >Ni(II) >Ag(I) >Cd (II) >Mn(II) >Pb (II) >Co(II) >Cr(III)
(série 2)

Cu(II) >Zn(II) >Cd (II) >Cr(III) >Pb(II) (série 3)

Hg(II) >Cu(II) >Ni(II) >Zn (II) (série 4)

Cu (II) >Ni (II) >Zn(II) >Co(II) >Mn(II) (série 5)

Cu(II) >Ni(II) >Zn (II) >Co (II) (série 6)

Cu(II) >Ni (II) >Co(II) >Mn(II) (série 7)

Cu (II) >Hg (II) >Cd(II) >Ni (II) >Pb (II) (série 8) [106]

Pd(II) > Au(II) > Hg (II) > Pt(II) > Cu (II) > Ni(II) > Zn(II) > Mn(II) > Pb(II) > Co(II)
> Cr(II) > Cd(II) > Ag(I) (série 9) [24]

Ces séries sont obtenues principalement pour des chlorures de métal ou des sulfates dans des solutions aqueuses avec un pH soit non indiqué soit reporté être dans la gamme de 5.2-5.6 (série 5), proche de la neutralité (série 3 et 4), pH7 (série 6) et pH5 (série 8).

Les séries enregistrées prouvent que l'affinité du chitosane envers les ions des métaux de transition obéit à la série de stabilité des complexes d'ions métalliques d'Irving-Williams. [111]

La figure 2.1 montre la sélectivité ionique du chitosane envers les cations divalents et trivalents.

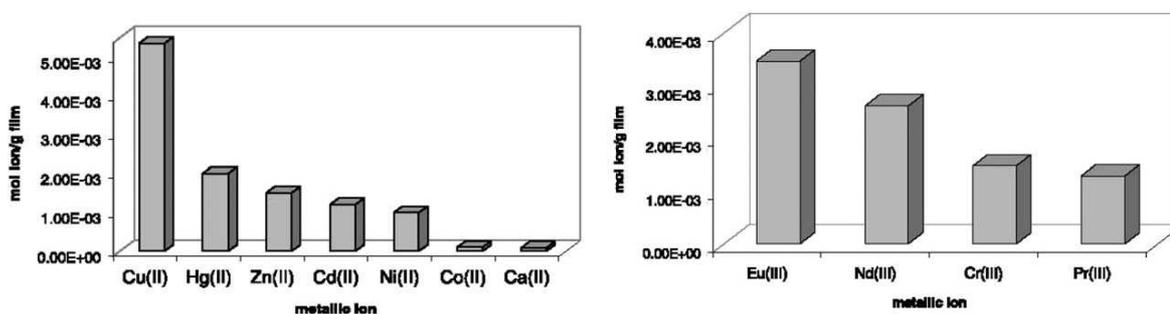


Figure 2.1 : la sélectivité ionique du chitosane : la quantité (moles) de cations divalents et trivalents fixée par g de film. [112]

2.3. Mécanismes d'interaction :

La plus grande partie des publications actuelles ont pour but l'étude de l'adsorption des ions métalliques et d'évaluer la cinétique et les isothermes d'adsorption. Peu de publications ont eu comme objectif de mieux comprendre le mécanisme d'adsorption [55] ou la structure de ces complexes de macroligand (par exemple les calculs ab initio). [11]

Le peu de publications qui ont traité le sujet de l'interaction entre le chitosane et les ions métalliques ont cité, habituellement, trois mécanismes d'interaction [28] :

- a- la chélation du métal
- b- attraction électrostatique ou l'échange d'ion
- c- formation de paire d'ions [28,113]

Le mécanisme d'interaction dépend de l'ion métallique et de sa spéciation, et la matrice de la solution et son pH, puisque ces paramètres peuvent affecter la protonation du polymère (répulsion du cation métallique) [55].

Bien que la formation de paire d'ions est plus intéressante pour l'interprétation de la rétention de quelques cations métalliques alcalins ou alcalino-terreux (par exemple : rétention de paire d'ions formée par interaction du strontium avec les anions carbonate). Les mécanismes les plus intéressants impliqués dans

l'interprétation de l'interaction chitosane-ion métallique sont la chélation et les interactions électrostatiques. [28]

2.3.1. Chélation:

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour l'interprétation des mécanismes d'interactions entre le chitosane et les ions métalliques, deux modèles ont été proposés :

- (a) le modèle de pontage ou le complexe de pontage et
- (b) le modèle pendant ou le complexe pendant

Dans le modèle de pontage, les ions métalliques sont liés à plusieurs groupements amines de la même chaîne ou de chaîne différente, à travers une chélation inter ou intramoléculaire.

Par opposition au modèle de pontage, dans le modèle pendant l'ion métallique est lié à un seul groupement amine dans la forme pendante. [55,96]

2.3.2. Attractions électrostatiques / échange d'ions:

Ce type d'interaction est gouverné, principalement, par le pH fortement acide de la solution et de la complexation de l'ion par d'autres ligands solubles.

Les groupements amines sont facilement protonés dans les solutions acides et le polymère est ainsi dissous. Cette protonation peut causer des attractions électrostatiques entre le chitosane et des composés anioniques tel que les anions métalliques (résultant de la complexation des ions métalliques par les chlorides et les ligands anioniques) [55]. Il est à noter que l'adsorption d'un ion métallique de valence n par mécanisme d'échange de cation conduit à la libération de n ions d'hydrogène. [106]

La réduction du taux de complexation des cations métalliques dans les solutions acides est une autre conséquence de la protonation des groupements amines. Elle est due à la compétition entre les protons et les cations pour l'interaction avec les groupements amines. [28]

La chélation des cations métalliques par les ligands présents dans la solution peut conduire à la formation d'anions métalliques. Par conséquent, l'interaction de l'ion

métallique avec le chitosane par un mécanisme d'attraction électrostatique aura lieu à travers l'échange des contre ions associés aux groupements amines protonés par les anions métalliques [114] au lieu du mécanisme de chélation. [55] Pour les anions métalliques tel que les complexes anioniques du platine, palladium ou l'or avec les ions chlorures, ou les chromates, les molybdates, ou les vanadates le mécanisme de sorption implique leur attraction électrostatique par les groupements amines protonés. L'intervalle de pH optimum pour la sorption du métal et la stabilité du polymère est de pH 2-4. Cette gamme optimale de pH est expliquée par deux raisons :

- a- la spéciation de l'anion métallique (formation d'espèces adsorbable : prédominance des formes polynucléaires des molybdates, vanadates ou les complexes chloro-anions).
- b- la protonation des groupements amines (pour l'équilibre électronique) et la compétition entre les anions (provoquée par l'acide : l'acidité excessif limite fortement la performance de la rétention). [28]

2.4. Paramètres influant l'interaction chitosane-ion métallique :

La formation du complexe chitosane-ion métallique a lieu premièrement à travers les groupements amines du chitosane comme ligands.

Parmi les facteurs qui contrôlent la formation de ces complexes, les plus importants sont :

- 1- la concentration totale des groupements amines dans le chitosane qui est directement lié au DD.
- 2- la disponibilité ou l'accessibilité des groupements amines qui dépend de la configuration géométrique de la matrice du chitosane. [111]

Ce n'est pas la fraction des groupements amines libres qui est déterminante du taux de chélation mais plutôt le nombre de groupement amines libres accessibles. En effet, le nombre total de ces groupements n'est pas nécessairement accessible aux métaux, quelques uns de ces sites amines sont impliqués dans des liaisons hydrogènes inter- ou intramoléculaire. De plus, la cristallinité du polymère peut influencer l'accessibilité aux sites de chélation. [55]

2.5. L'interaction chitosane-cuivre (II) :

L'interaction du chitosane avec les cations de cuivre a été la plus étudiée. Une haute capacité de sorption a été obtenue, elle est de l'ordre de 200 mg de Cu^{2+} par gramme de chitosane. [28]

Le cation de cuivre dans une telle interaction est lié simultanément à un groupement NH_2 et à un groupement OH libre sur C6 de l'unité glucosamine du chitosane. La sphère de coordination du cuivre de quatre sites est complétée par deux molécules d'eau suivant le model pendant.

L'autre possibilité, le model de pontage, consiste à remplacer les deux molécules d'eau par une autre paire d'atomes d'oxygène de la même ou d'une autre chaîne polymérique pour compléter la sphère de coordination du cuivre.

Dans les deux cas, la charge positive du cation est neutralisée par un contre ion. [57]

Il a été démontré que le chitosane forme un complexe unique avec le cuivre, sa structure est similaire à $[\text{Cu NH}_2(\text{OH})_2]^{2+}$ à pH en dessous de 6,1.

En considérant la sphère de coordination du cuivre, le quatrième site peut être occupé par soit une molécule d'eau ou un groupement OH dans la position C3.

Cette hypothèse a été récemment confirmée par des mesures calorimétriques, l'ion de cuivre est lié à trois atomes d'oxygène et un atome d'azote avec une géométrie carré plan ou tétraédrique.

Des différences sont observées dans le mécanisme de sorption et/ou la spéciation du métal adsorbé sur le polymère quand les conditions expérimentales sont altérés (pH, concentration du métal, le rapport métal / ligand).

Le changement de la conformation du polymère (état dissous, état solide...) influe sur le mécanisme de coordination et plus spécifiquement sur le type de complexe formé entre le cuivre et les groupements amines. [55]

Le monomère du chitosane (unité glucosamine) n'est pas très efficace pour la complexation du cuivre. Les oligomères (chitosane dépolymérisé) ont montré plus d'efficacité dans la complexation de cuivre.

E. Guibal dans sa revue [55] a rapporté que Shahgoli et al ont observé une forte chélation entre le cuivre et le chitosane tetrasaccharide, tandis que Rhazi et al ont trouvé que le seuil du degré de polymérisation de l'oligomère est de 6. [55] Le besoin de la polymérisation est une autre pièce d'évidence qui prouve la contribution de plusieurs unités glucosamine dans le mécanisme de chélation, certainement, dû à la contribution des groupements hydroxyles des unités vicinaux ensemble avec le groupement amines d'un monomère donné dans la rétention de l'ion de cuivre. [55]

La figure 2.2 montre deux des structures possibles des complexes chitosane-cuivre (II).

La tableau 2.1 regroupe les caractéristiques d'adsorption (la constante de dissociation apparente de Langmuir (K_d) et la capacité maximale de l'adsorbant (q_m)) de quelques formes de chitosane envers le cuivre

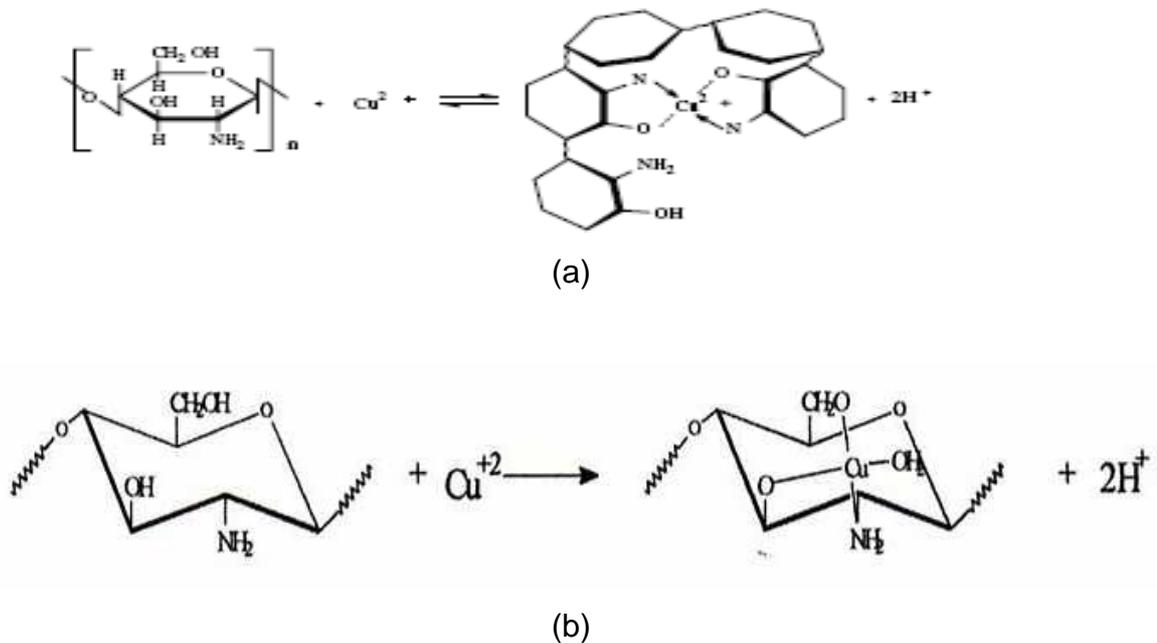


Figure 2.2 : Les structures des complexes chitosane –cuivre (II) disponibles dans la littérature : (a [68]) et (b [21])

Tableau 2.1 : les caractéristiques d'adsorption (la constante de dissociation apparente de Langmuir (Kd) et la capacité maximale de l'adsorbant (qm)) de quelques formes de chitosane envers le cuivre [37]

adsorbant	pH	qm (mmole/g)	Kd (mmole/l)
Flocons de chitosane	4.7-5.4	2.75	0.26
Poudre de chitosane	5	0.71	0.03
Carapace des crevettes roses	6	0.27	0.19
Chitosane réticulé	5	3.91	4.14

2.6. Formation des complexes chitosane-ion métallique :

La littérature rapporte la formation des complexes chitosane-ion métallique selon deux méthodes : [11,20]

1-méthode de coprécipitation : le chitosane est utilisé à l'état dissout en contact avec la solution métallique. Le complexe est précipité avec un contre solvant à la fin de la réaction

2- méthode d'adsorption : le chitosane est mis en contact à l'état solide (grains, flocons ou membrane) avec la solution métallique aqueuse. L'ion métallique sera adsorbé sur le chitosane par complexation ou par échange d'ion ou par adsorption physique (les forces de Van der Waals) et le produit final sera uniquement lavé à la fin de la réaction.

La réaction de formation du complexe chitosane-ion métallique est présentée comme suit :



On suppose que la chélation d'un seul ion métallique par plusieurs groupements – NH₂ et NHCOCH₃ isole effectivement chaque ion métallique de ces voisins. Ce qui permet l'utilisation du chitosane dans le traitement des eaux usées. [41]

2.7. Applications des complexes chitosane-ion métallique :

2.7.1. La dégradation du chitosane :

La production de chitosane de faible poids moléculaire est très demandée pour ces applications en médecine, en cosmétique et en agriculture. Il a une efficacité physiologique spéciale comme antitumeur, antifongique, antibactérien, réducteur du niveau de cholestérol, rétention de l'eau et autres par rapport au chitosane de poids moléculaire élevé. [8,12]

L'efficacité du chitosane est avéré être dépendante de son poids moléculaire ; entre cinq échantillons avec des poids moléculaires de 1500, 3000, 8000, 13000 Da, l'échantillon de 1500 Da a une meilleur activité antifongique. Les produits avec un poids moléculaire de 1500 et 3000 Da présentent une meilleure capacité de retenir l'eau.

La capacité du chitosane à diminuer la graisse dans le sang est considérablement plus grande pour les poids moléculaires de 8000-20.000 Da que celle du chitosane oligomérique (chitosane dégradé).

Donc, il est très important de contrôler le poids moléculaire du chitosane, lors de sa dégradation pour satisfaire les exigences de son utilisation.

Jusqu'à présent, plusieurs méthodes ont été proposées pour la dégradation du chitosane :

- La dégradation enzymatique par le chitinase, le chitosanase [115], lipase, protéinase, polysaccharase, et les lysozimes [19]
- la dégradation physique par les rayons -X et par micro-onde [115].
- les méthodes chimiques tel que l'hydrolyse acide par les acides inorganiques (HCl, HF, H₂SO₄, H₃PO₄, HNO₃) ou avec les acides organiques tel que l'acide acétique et l'acide formique.

- l'hydrolyse oxydative avec un oxydant tel que l'eau oxygénée (H_2O_2), l'ozone (O_3), et l'acide peracétique (CH_3COOOH).

Ces méthodes sont utilisées usuellement pour la dégradation du chitosane. [12]

A l'exception de la méthode du chitosanase, qui peut donner des oligomères de 6 à 8 résidus glucosamines, les autres méthodes produisent du chitosane de bas poids moléculaire avec une mauvaise distribution des unités glucosamines et un rendement très faible.

X. Yin et al [12] ont amélioré une nouvelle méthode de production du chitosane à faible poids moléculaire avec une distribution uniforme des unités glucosamines. Cette méthode est basée sur la dégradation oxydative du chitosane après une réaction de complexation avec les métaux de transition (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) pour un rapport molaire chitosane : ion métallique de 1 : 8.

Ce rapport permet une distribution uniforme et constante du métal le long de la chaîne de chitosane.

La liaison de coordination affaiblit les liaisons qui entourent le site de coordination et cause quelques points faibles dans la chaîne du chitosane. [12]

Une faible quantité de H_2O_2 (50-100 μ l) est ajoutée à la solution de chitosane pour attaquer les points faibles provoqués par la liaison de coordination et produire ainsi des fragments de chitosane de 8 unités glucosamines.

H_2O_2 est utilisé comme oxydant parce que son produit après réduction est H_2O ce qui simplifie le processus de séparation.

La solution du complexe dégradé est passée à travers une colonne qui contient une résine échangeuse de cation pour éliminer les ions métalliques encore présents sur le chitosane.

Après la séparation et le séchage, on obtient du chitosane de faible poids moléculaire. [12]

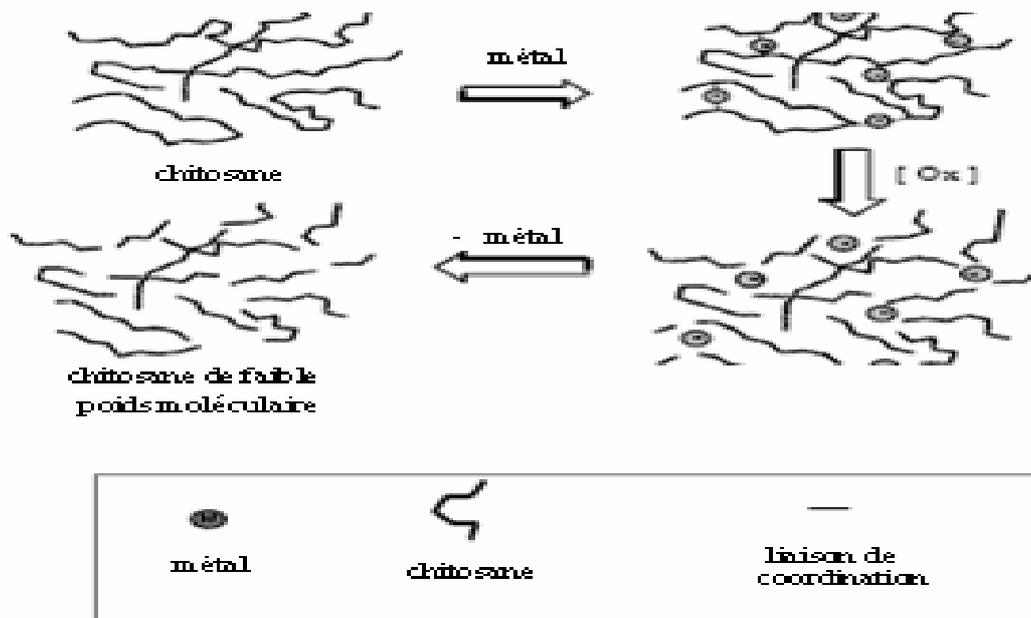


Figure 2.3 : La dégradation du chitosane sous l'effet des liaisons de coordination [12]

2.7.2. Applications catalytiques :

Le développement de procédés catalytiques basés sur l'emploi des métaux précieux et stratégiques (groupe du platine) et des supports catalytiques à base de polymère a conduit à améliorer la récupération du métal à la fin de la réaction catalytique.

L'avantage de l'emploi des polymères comme supports catalytiques réside dans la plus forte interaction du métal avec le polymère qu'avec les supports conventionnels. De plus, la structure du polymère peut augmenter la sélectivité de la réaction.

Les biopolymères sont fréquemment cités comme des supports possibles pour des séparations énantiosélectives. Le chitosane a été utilisé pour la séparation des isomères optiques d'acides aminés. [55]

La facilité avec laquelle ce biopolymère réagit avec les ions métalliques, la conformation du chitosane et sa flexibilité peuvent expliquer le nombre des études récentes concernant son utilisation comme support catalytique [27,55,116].

Le premier emploi du chitosane comme support catalytique dans la préparation de catalyseurs d'hydrogénation remonte au début des années quatre-vingt. [55]

La facilité avec laquelle il peut être modifié physiquement et chimiquement a ouvert de nouvelles perspectives pour la fabrication de nombreux catalyseurs pour plusieurs applications notamment l'oxydation, les réactions de polymérisation d'ouverture de cycles, la synthèse chimique fine, aussi bien que les réactions d'hydrogénation et de réduction. [27,55]

Les paramètres critiques pour la préparation de catalyseurs supportés de chitosane sont :

- 1- la porosité, la diffusion et l'accessibilité aux sites.
- 2-la concentration du métal et son état d'oxydation.
- 3-la structure moléculaire du complexe chitosane-métal [27]

2.7.3. Application comme agent antibactérien :

L'activité antibactérienne du chitosane et de ces dérivés contre plusieurs bactéries a été reconnue et considérée comme l'une de ces propriétés les plus importantes dans ces applications biologiques possibles. [10]

L'exploitation de nouvelles sources naturelles et leurs dérivés pour contrôler les maladies pathogéniques est devenue une préoccupation mondiale.

La priorité est donnée aux produits qui réduisent le nombre de décès et évitent les effets secondaires et négatifs sur la santé humaine. [1]

2.7.3.1. Mécanismes de l'activité antibactérienne:

L'intensification des groupements amines protonés (NH_3^+) sur le chitosane dans les solutions acides conduit à l'augmentation de la quantité de chitosane adsorbé sur la surface des bactéries.

Cette adsorption conduit à de grands changements dans la structure des parois cellulaires et dans la perméabilité de la membrane cellulaire. Ces deux effets conduisent à la destruction de la cellule bactérienne. [36]

Le mécanisme exact de l'activité antibactérienne du chitosane et de ses dérivées n'est pas parfaitement connu, cependant, plusieurs mécanismes possibles ont été proposés :

- l'interaction entre les groupements amines cationiques et les anions des parois cellulaires des bactéries,
- l'interruption du transport de masse à travers les parois cellulaires et l'inhibition de la biosynthèse,
- le blocage des transcriptions ARN par adsorption du chitosane protoné à l'ADN bactérien [1,10].

Ce sont des mécanismes possibles pour l'accélération de la destruction des bactéries. [5,89]

Les deux mécanismes d'inhibition les plus acceptés sont :

Le premier explique l'action du chitosane de haut poids moléculaire qui peut altérer la perméabilité de la membrane cellulaire des bactéries et empêcher le rassemblement des constituants de la cellule pour sa reconstruction.

S. K. Kim et al [10] suggèrent que le site d'action de ce type de chitosane est probablement l'enveloppe bactérienne et la mort des microorganismes est probablement due à la destruction de la membrane des bactéries.

Ce mécanisme est expliqué par la charge positive du chitosane qui facilite la formation de liaisons entre les groupement amines à la position C2 du monomère glucosamine et les groupement d'acide carboxylique chargé négativement présent dans les macromolécules de la surface des parois cellulaires des bactéries. Ils forment ensemble un complexe polyélectrolytique.

Celui là peut réagir comme une couche imperméable qui enveloppe la cellule et supprime l'activité métabolique des bactéries en bloquant la perméabilité aux éléments nutritifs à travers les parois cellulaires. [10,117]

Le deuxième mécanisme explique l'action du chitosane de faible poids moléculaire grâce auquel il peut entrer facilement à l'intérieur des cellules.

Puisque le chitosane peut adsorber et flocculer les substances électronégatives dans la cellule, il détruit l'activité physiologique des bactéries et les tue.

L-Y. Zheng et al [117] ont étudié l'effet antibactérien du chitosane avec un poids moléculaire inférieur à 305 kDa contre *S. aureus* et *E. coli*. Pour *S. aureus* le mécanisme dominant est le premier mécanisme déjà expliqué, tandis que le deuxième mécanisme est le plus approprié pour *E. coli*. Les micrographes électroniques des bactéries à gram positif (*S. aureus*) et négatif (*E. coli*) en présence du chitosane montrent que la cellule membranaire de *S. aureus* est affaiblie ou éventuellement détruite, tandis que le cytoplasme de *E. coli* est concentré et l'interstice des cellules est clairement élargi. Cela indique que le mécanisme de l'activité antibactérienne du chitosane contre les bactéries à gram négatif est différent de celui contre les bactéries à gram positif.

Cette étude indique que le mécanisme de l'activité antibactérienne du chitosane est différent selon les types de bactéries (gram positif et gram négatif). Par ailleurs, le mécanisme antibactérien du chitosane peut être différent des autres polysaccharides à cause de la présence de la charge positive sur la surface du chitosane. [117]

L'activité antibactérienne du chitosane est fortement dépendante de son poids moléculaire. Il doit être inférieur à une valeur critique, qui permet la pénétration des molécules dans les cellules bactériennes. [10,117]

2.7.3.2. Les paramètres influant l'activité antibactérienne du chitosane :

2.7.3.2.1. Effet des caractéristiques du chitosane :

L'activité antibactérienne du chitosane est sensiblement affectée par son poids moléculaire, le nombre de groupements amines, le pH du milieu, la solubilité du chitosane et sa charge positive en milieu acide. [1, 10,36]

Néanmoins, les facteurs principaux qui affectent l'activité antibactérienne du chitosane sont le poids moléculaire et la concentration. [7]

La concentration minimal inhibitrice du chitosane est entre 0.005 et 0.1% tout dépend de l'espèce bactérienne, le poids moléculaire du chitosane, et le pH de la solution. [7]

Le nombre des groupements amines dépend du degré de désacétylation (DD) et le degré de polymérisation (DP) du chitosane. On a observé que le taux de décès des cellules bactériennes s'accroît avec l'augmentation du DD [31]. Dans la plus part des cas, le chitosane avec un DD entre 85 et 95% a montré la plus haute activité antibactérienne. [10,36]

Une meilleure adsorption du chitosane par la surface cellulaire des bactéries est observée entre pH 4.0 et 5,0 [36], tout en notant que l'activité antibactérienne du chitosane augmente avec la diminution du pH dans cette gamme de pH [118].

Des études récentes ont montré que le chitosane avec un faible poids moléculaire dans la gamme de 5 à 10 kDa montre une activité bactéricide et biologique plus grande quand on le compare avec le chitosane de poids moléculaire élevé. [7, 8,9]

En général, le chitosane avec un bas poids moléculaire entre 5 et 27kDa est reconnu généralement comme étant efficaces contre la multiplication des bactéries.

Cependant, le chitosane de poids moléculaire de 30 kDa n'est pas utilisé comme agent antibactérien dû à sa faible solubilité dans les solutions aqueuses à pH neutre. [10]

Puisque la charge positive favorise l'activité antibactérienne du chitosane, la modification des groupements amines à la position C2 du glucosamine par des groupes fortement chargés positivement est recommandée pour améliorer l'activité antibactérienne. [10]

X. Wang et al [22,23] ont étudié l'effet de la structure des complexes chitosane-Zn(II), chitosane-Cu(II), et chitosane-Fe(II) sur leur activité antibactérienne contre des bactéries à gram négatif et des bactéries à gram positif. Ils ont constaté que l'introduction de ces métaux au sein du chitosane par chélation conduit à l'intensification de la charge positive sur le chitosane et donc à l'amélioration de son activité antibactérienne.

2.7.3.2.2. Effet des propriétés de charge des parois cellulaires des bactéries:

En plus des caractéristiques de chitosane positivement chargé, la distribution de charge sur la surface des cellules bactériennes semble avoir un rôle considérable sur l'activité antibactérienne du chitosane et de ces dérivés. [10]

Y-C. CHUNG et al [36] ont étudié et démontré la relation entre l'activité antibactérienne du chitosane et les caractéristiques de la surface des parois cellulaires des bactéries. Ils ont employé du chitosane, extrait à partir des carapaces des crevettes avec des degrés de désacétylation de 75% et 95%.

Ils ont examiné leurs effets antibactériens contre cinq bactéries, trois bactéries à gram négatif qui sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* et deux bactéries à gram positif *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus faecalis*, au moyen de l'analyse de l'hydrophilicité, la charge négative de la cellule bactérienne et la quantité de chitosane adsorbé sur la surface cellulaire. Les résultats ont montré que :

La charge négative sur la surface cellulaire des bactéries à gram négatif est supérieure à celle des bactéries à gram positif.

Pour mieux comprendre l'effet de la charge négative de la surface cellulaire sur l'activité antibactérienne du chitosane, la quantité de chitosane bactéricide adsorbée sur les différentes bactéries a été déterminée et regroupée dans le tableau 2. 2.

Tableau 2.2 : La quantité de chitosane adsorbée (μg de chitosane / 10^9 bactérie / ml) sur les différentes cellules bactériennes, en fonction du pH et du DD. [36]

Conditions	G (-)			G (+)	
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Samonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
pH=5					
DD 95%	22.5	20.6	18.7	17.5	16.8
DD 75%	18.8	17.3	15.4	14.2	12.7
pH=4					
DD 95%	25.3	23.6	21.8	18.3	17.9
DD 75%	21.6	19.2	17.1	16.6	15.4

Les auteurs ont conclu que le chitosane est plus adsorbé sur la surface des bactéries à gram négatif que ceux à gram positif.

L'hydrophilicité des parois cellulaire n'explique pas complètement la différence entre l'activité antibactérienne du chitosane contre les bactéries testées, par contre la charge de surface cellulaire le fait [36]. Cela explique clairement pourquoi la plus part des bactéries à gram négatif sont sensible au chitosane.

La charge négative et sa distribution sur la surface cellulaire sont apparemment les facteurs déterminants de l'activité antibactérienne du chitosane et de ces dérivés. [10]

CHAPITRE 3

MATERIAUX ET ESSAIS

Trois grandes manipulations constituent la partie expérimentale de ce travail, qui sont :

- 1- Extraction et caractérisation de la chitine et son dérivé le chitosane.
- 2- Formation et caractérisation de sept complexes métalliques chitosane-cuivre (II)
- 3- Evaluation de l'activité antibactérienne du chitosane et des sept complexes chitosane-cuivre (II) contre la salmonelle et étude de la corrélation structure-activité antibactérienne.

Tous les produits utilisés dans ce travail sont de grade analytique de source Aldrich et Fluka, ils ont été utilisés tels quels sans aucune purification.

Les produits et le matériel utilisés dans l'évaluation de l'activité antibactérienne ont été fournis par l'institut Pasteur d'Alger. Il s'agit de la salmonelle (présente dans un gel conservateur), le bouillon nutritif, la gélose hektoén et son additif, l'eau physiologique stérile (0,9%) et l'eau distillée pH 7.

Les mesures de l'absorbance à 620nm ont été faite avec un spectrophotomètre BIBBY, Anadéo RS232.

Les spectres IRTF ont été enregistré dans l'intervalle de 400 à 4000 cm^{-1} , à l'aide d'un spectrophotomètre à transformée de fourrier de marque SHIMADZU munit du logiciel «WinFirst». L'appareil utilisé pour l'analyse élémentaire est de type LECO CHN-900 munit d'un détecteur infrarouge. Les diffractogrammes ont été enregistrés à l'aide d'un diffractomètre de marque Bruker, model D-8.

Le poids moléculaire du chitosane a été déterminé à l'aide d'un viscosimètre à tube capillaire de type AVS 310. La mesure de la quantité de cuivre dans les complexes a été faite par un spectrophotomètre d'absorption atomique de type PYE AM901, marque PHILIPS.

Les spectres électroniques ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre de marque VARIAN Cary Win UV.

3.1. Extraction de la chitine et sa conversion en chitosane :

3.1.1. Extraction de la chitine :

3.1.1.1. Source naturelle employée :

Les carapaces des crevettes rouges, « *aristeus antennatus* » : le nom scientifique (source : <http://www.minefi.gouv.fr>), sont la source naturelle qu'on a employé pour l'extraction de la chitine. Elles ont été obtenues le mois de mars 2006 à partir du port de Bouharoun, Wilaya de Tipaza.

Les crevettes ont été soigneusement décortiquées en séparant la partie abdominale [41] des antennes, pieds, et queues [119]. Cela a été entrepris sous le prétexte que la partie abdominale contient moins de lipides [41] 4Kg de crevettes rouges ont donné 105g de la partie abdominale et 110g du reste (antennes, pieds et queues).

Les deux parties des carapaces sont représentées sur la figure 3.1 a et b



a



b

Figure 3.1 : Les carapaces des crevettes rouges, a : la partie abdominale, b : la partie restante

Les carapaces ont été lavées plusieurs fois avec l'eau de robinet, séché pendant une semaine à l'air libre puis moulues avec un mixeur domestique.

Pour éviter la dégradation microbologique et enzymatique qui réduit le rendement en chitine, les deux parties ont été conservées séparément au congélateur dans des sacs en plastique à -20°C jusqu'au moment d'utilisation. [119]

Pour extraire la chitine, les carapaces ont subi un traitement de déprotéinisation puis un autre de déminéralisation suivie d'une décoloration et finalement le séchage.

3.1.1.2. La déprotéinisation :

Les particules de chaque partie ont été ajoutées lentement à l'aide d'une spatule et un entonnoir en papier à une solution de NaOH 2,5 M avec une proportion de 1:10 (g de carapaces / ml de solution) à température ambiante sous agitation constante de 350 rpm pendant 8 heures. [120]

Au bout de ce temps, les carapaces ont été filtrées à travers un entonnoir de Buchner et lavées plusieurs fois avec de l'eau distillée jusqu'à pH neutre (élimination totale du NaOH).

La déprotéinisation a été entretenu une fois

3.1.1.3. La déminéralisation :

Les même carapaces, à la suite de la déprotéinisation, ont été mises progressivement dans une solution d'HCl 1,7 M à température ambiante avec un rapport carapace : solution de 1:10 (g:ml), sous agitation constante de 350 rpm pendant 8 heures. [120]

Le produit a été filtré et lavé plusieurs fois avec de l'eau distillée jusqu'à pH neutre.

La déprotéinisation a été entretenu une fois

Le produit obtenu après ces deux traitements est supposé être la chitine. Celui issu de la partie abdominale est rose claire et celui issu du reste est de couleur plus foncée. Donc une étape de décoloration est demandée.

3.1.1.4. La décoloration :

Pour éliminer les pigments naturels, la partie abdominale a subi une extraction avec l'acétone une fois puis un lavage avec l'eau distillée plusieurs fois.

La chitine issue de la partie restante des carapaces a subi un traitement différent à cause de sa couleur plus foncée, elle a été mise dans l'acétone à 60°C sous agitation constante pendant 30 minutes puis lavée plusieurs fois avec l'eau distillée [107]

En prenant en compte que la chitine va être conservée pour plusieurs mois, il fallait déshydrater le produit en le lavant 3 fois avec le méthanol. [42]

3.1.1.5. Le séchage :

La chitine a été mise sur un plateau en verre à l'air libre pour le séchage pendant 3 jours puis mise dans un dessiccateur avant d'être pesée pour déterminer le rendement.

Le produit a été conservé dans une boîte en polyéthylène jusqu'à utilisation.

3.1.2. Préparation du chitosane :

Le chitosane est préparé à partir de la chitine par la désacétylation de cette dernière comme suit :

La chitine a été ajoutée lentement sous agitation constante de 350 rpm à une solution de NaOH 50% (poids / volume), mise dans un ballon à fond rond de trois cols de 500 ml, pour un rapport chitine:solution de 1:30 (g:ml) et chauffé à reflux à la température de 107°C pendant 2 heures [121].

Les deux produits issus des deux parties des carapaces ont subi le même traitement.

Le chitosane obtenu après 2 heures de réaction a été filtré à travers un entonnoir de Buchner et lavé avec de l'eau distillée chaude pour éliminer le NaOH

jusqu'à pH neutre puis déshydrater avec le méthanol et séché à l'air libre pendant 3 jours et finalement pesé.

3.1.3. Caractérisation de la chitine et du chitosane :

Les deux produits ont été identifiés par spectrométrie infrarouge IRTF, par analyse élémentaire et par diffraction des rayons X (DRX).

Le degré de désacétylation de la chitine et du chitosane ont été déterminés par analyse élémentaire, et IRTF et titrage potentiométrique, respectivement.

Le poids moléculaire viscosimétrique du chitosane a été déterminé par la méthode viscoscopique.

Le chitosane n'est exposé à l'analyse élémentaire, au titrage potentiométrique et à la mesure de viscosité qu'après son nettoyage (voir section prétraitement du chitosane). Tandis que l'enregistrement de son spectre IRTF a été fait avant et après son nettoyage.

3.1.3.1. Caractérisation par la spectrométrie IRTF :

Les produits ont été caractérisés par la spectrométrie à transformée de Fourier (IRTF) au moyen des pastilles de KBr préparée comme suit :

Une petite quantité de chaque produit est séchée à 105°C pendant 1heure puis moulue. À 2mg de cette poudre on ajoute 150 mg de KBr (qualité IR), bien homogénéiser le mélange dans un mortier puis préparer les pastilles sous une force de 10.000 N. Le spectre IRTF a été enregistré dans l'intervalle de 400 à 4000 cm⁻¹.

Le spectre IRTF du chitosane est utilisé également dans la détermination du degré de désacétylation en utilisant l'équation suivante : [67]

$$DD = 87.8 \cdot [3(A_{1655}/A_{3450})] \quad (\text{eq 3.1})$$

Où A_{1655} et A_{3450} sont les absorbances de la bande amide I à 1655 cm^{-1} , une mesure du contenu en groupement N-acétyle, et la bande hydroxyle situé à 3450 cm^{-1} , respectivement.

3.1.3.2. Caractérisation par l'analyse élémentaire :

La chitine et le chitosane ont été caractérisés par analyse élémentaire. Cette analyse est basée sur la combustion de l'échantillon à analyser. Après la combustion du biopolymère, les gaz obtenus passent à travers une cellule infrarouge entre deux fenêtres de CaF_2 où ils seront détectés. Les résultats ont été utilisés pour la détermination du degré de désacétylation de la chitine à travers l'équation (1.2)

3.1.3.3. Caractérisation par la diffraction des rayons X (DRX) :

Les diffractogrammes de la chitine et du chitosane ont été enregistrés dans le rang de 2θ entre 4 et 40° .

3.1.3.4. Mesure de la viscosité et détermination du poids moléculaire :

La mesure de la viscosité dans $0.2\text{ M NaCl} / 0.1\text{ M CH}_3\text{COOH}$ a été faite en utilisant un viscosimètre de type Ubbelohde.

Afin de préparer une solution de chitosane de concentration 0.04 g/dl , 0.02g a été dissoute dans 50 ml de solvant, laissé pendant 4h à température ambiante puis filtré dans un fritté pour éliminer les impuretés.

On a mesuré le temps d'écoulement du solvant en mettant 15 ml dans le tube capillaire mis dans un bain marie maintenu à température constante de $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Puis, on a mesuré celui du chitosane avec des concentrations de $0,04\text{ g/dl}$, $0,03\text{ g/dl}$, $0,02\text{ g/dl}$ et $0,01\text{ g/dl}$ en préparant à chaque fois une dilution de la solution précédente pour avoir la concentration voulu et en lavant à chaque fin de mesure le tube capillaire par le solvant. Les mesures sont refaites plusieurs fois et les valeurs prises en compte sont celles qui ont une différence de 0.1s .

Le poids moléculaire viscosimétrique moyen a été calculé en utilisant l'équation de Marc-Houwink (equation 1.6) avec: $K = 1,81 \times 10^{-3}$ ml/g et $a = 0,93$.

3.1.3.5. Titrage potentiométrique :

La détermination potentiométrique du degré de désacétylation a été faite suivant une méthode de titrage acido-basique modifiée par X. Jiang et al [69]

0,3g de chitosane est dissout dans 25 ml d'une solution d'HCl 0,1042 M pendant 4h puis on lui ajoute 100 ml d'eau distillée.

Une quantité calculée de KCl (0,737g) est ajoutée à la solution pour ajuster sa force ionique (I) à 0,1. [69,122]

La quantité de KCl est calculée à partir de la formule :

$$I = \frac{1}{2} \sum z_i^2 c_i \quad (\text{eq 3.2})$$

avec :

I : est la force ionique de la solution

z_i : le nombre de charge portée par l'espèce chimique i

c_i : la concentration molaire de l'espèce chimique i (en mol/L) [123]

Le titrant était un mélange de NaOH 0,1025 M et KCl 0,1 M.

La modification portée par X. Jiang et al [69] consiste à fixer l'intervalle de pH, dans lequel le titrage sera effectué, entre 2 et 6 puisque au delà du pH 6 le chitosane se précipite.

Donc, on ajoute le titrant jusqu'à pH2 puis on ajoute à chaque fois 0,5 ml et on note le pH jusqu'à la valeur de 6.

La courbe de titrage $\text{pH} = f(V_{\text{NaOH}})$ sera tracée et le DD sera déterminé par l'équation suivante :

$$\text{DA} = 16,1(y - x) f/w \quad (\text{eq 3.3})$$

Avec :

y et x sont les volumes de la solution de NaOH consommés au points d'équivalence (ml)

f est la molarité du titrant (NaOH) (mol/l)

w est le poids initiale du chitosane (g)

3.2. Formation des complexes chitosane-cuivre

3.2.1. Prétraitement du chitosane :

On a constaté, d'après le spectre IRTF, que le chitosane préparé a été contaminé. Il a probablement interagit avec des impuretés susceptibles d'être présente sur le plateau sur lequel le séchage a été entreteu.

Dans ce cas, une étape de nettoyage (régénération) avant son emploi dans la formation des complexes a été entreprise.

Le chitosane a été mis progressivement dans un bécher qui contient une solution de NaOH 0,2M sous agitation constante à température ambiante pendant 2h, puis filtré et lavé avec de l'eau distillée plusieurs fois. Ensuite il a été mis dans un mélange méthanol-eau (50-50) sous agitation pour 1h afin d'améliorer l'accessibilité du métal aux sites d'azote. [113]

Le produit après lavage avec l'eau distillée sera séché à l'air libre pendant 3 jours.

3.2.2. Formation des complexes :

Sept complexes chitosane-cuivre ont été préparés avec différents rapports molaires cuivre:unité glucosamine (l'unité glucosamine du chitosane est $(C_6H_{11}O_4N)$, elle est de 161g/mol). Ils sont regroupés dans le tableau 3.1

Le chitosane (0.5 g) est mis dans 30 ml d'acide acétique 1%(v/v) pendant 20h, c'est la quantité qui a été utilisée pour la formation de chaque complexe.

Sept solutions de nitrates de cuivre $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ de 10 ml ont été préparées avec des concentrations différentes correspondantes aux rapports molaires de chaque complexe. Ils sont représentés dans le tableau 3.2

Avec un pH mètre on prend le pH de la solution de chitosane présente dans un bécher et on l'augmente à 6,2 (pH de formation du complexe chitosane-cuivre[124]) avec du NaOH 0,1M. Puis on ajoute délicatement à l'aide d'une

millipipette la solution appropriée de nitrate de cuivre goutte à goutte sous agitation constante et à température ambiante en ajustant le pH de temps en temps, après l'ajout de quelques gouttes de la solution métallique, à 6.2.

Tableau 3.1 : Le rapport molaire correspondant à chaque complexe

Numéro du complexe	cuivre : unité glucosamine
complexe1	1 :1
complexe2	1 :2
complexe3	1 :3
complexe4	1 :4
complexe5	2 :1
complexe6	3 :1
complexe7	4 :1

Après le versement de la totalité des 10 ml de la solution de nitrate de cuivre, le mélange est laissé sous agitation constante (350 rpm) pendant 3h à température ambiante.

Au bout de 3h le complexe formé sera précipité en versant le contenu du bécher dans un autre qui contient une quantité en excès (quatre fois celle de la solution du complexe) d'une solution du contre solvant qui est le Na_2CO_3 0,1% (poids/volume).

Les précipités obtenus de couleur entre le bleu clair et le bleu foncé ont été lavés plusieurs fois avec de l'eau distillée pour éliminer les traces des ions de cuivre

présentes sur la surface du complexe, puis lavé par l'éthanol et séchés sous air à température ambiante pendant 3 jours puis pesés.

Tableau 3.2 : La quantité de cuivre utilisée dans la formation de chaque complexe

Numéro du complexe	quantité de cuivre (g)
complexe1	0,757
complexe2	0,379
complexe3	0,253
complexe4	0,189
complexe5	1,516
complexe6	2,27
complexe7	3,03

3.2.3. Caractérisation des complexes :

Les complexes ont été identifiés par la spectrométrie IRTF, spectrophotométrie UV-VIS, analyse élémentaire et par la spectrométrie d'absorption atomique (SAA). Les complexes 6 et 7 ont été caractérisés par la diffraction des rayons X (DRX)

3.2.3.1. Caractérisation par la spectrométrie IRTF :

Les pastilles ont été préparées suivant la même procédure et par le même appareil que ceux de la chitine et du chitosane

3.2.3.2. Caractérisation par la spectrophotométrie UV-VIS :

Des solutions de chitosane et des sept complexes ont été préparées avec une concentration de 3×10^{-3} g/ml ou 0,3% (poids/volume) dans l'acide chlorhydrique 0,3%.

La solution de chitosane a été prise comme ligne de base afin de n'avoir que les pics dus à la présence du cuivre au sein du complexe.

3.2.3.3. Caractérisation par l'analyse élémentaire :

Les complexes formés ont été caractérisés par analyse élémentaire suivant la même procédure et par le même appareil que la chitine et le chitosane.

3.2.3.3. Caractérisation par la diffraction des rayons X (DRX) :

Les diffractogrammes des complexes 6 et 7 ont été enregistrés dans le rang de 2θ entre 4 et 40° . Cette analyse est menée dans le but d'enregistrer le changement de structure dû à la complexation du cuivre.

3.2.3.4. Caractérisation par SAA :

La caractérisation des complexes chitosane-ion métallique par SAA peut se faire par deux méthodes : [19]

- ❖ La méthode indirecte : dans laquelle le filtrat est analysé pour connaître la concentration du cuivre qui n'a pas réagi avec le chitosane. En connaissant la concentration initiale de cuivre on pourra déduire la quantité de cuivre qui a interagi avec le chitosane.
- ❖ Méthode directe : dans laquelle une quantité du complexe est dissoute dans l'acide nitrique concentré, la solution sera analysé par SAA pour déterminer la concentration de cuivre qui a interagit avec le chitosane.

Dans notre travail, on a déterminé la concentration de cuivre dans les complexes par la méthode direct comme suit :

On tenant compte du rapport stoechiométrique de chaque complexe, on a préparé des solutions qui contiennent théoriquement (c'est-à-dire si le complexe c'est

formé effectivement dans le rapport préfixé) 10 ppm de cuivre. La procédure de calcul est comme suit :

Sachant que 10 ppm c'est 10 mg/l, on a calculé le nombre de mole de cuivre qu'il y a dans 10 mg de cuivre et on a trouvé 1.57×10^{-4} mole/l. Puis on a calculé la quantité de complexe qu'il faut peser, qui contient 1.57×10^{-4} mole de cuivre, en se basant sur le rapport stoichiométrique de chaque complexe.

La quantité du complexe calculée sera mise dans 1l de solvant (acide nitrique 1%), un échantillon de cette solution sera analysé par SAA.

En ayant la vraie quantité de Cu^{2+} présente dans la solution on peut avoir le vrai rapport stoichiométrique dans lequel le complexe c'est formé ainsi que le pourcentage de cuivre dans le complexe.

3.3. Application antibactérienne du chitosane et des sept complexes :

3.3.1. Mode opératoire :

3.3.1.1. L'obtention des colonies de salmonelle :

Une toute petite quantité du gel conservateur qui contient la salmonelle a été transmise avec un inoculateur à anse stérilisé à la flamme dans un tube à essai qui contient de l'eau physiologique (0,9%).

Dans ce tube on introduit un écouvillon qui a une extrémité en coton hydrophile pour prendre quelques gouttes d'eau et les étaler sur la surface d'une gélose hektoén (la gélose (agar) est un polysaccharide isolé à partir des algues marines rouges [125]). Elle est préparée en faisant fendre la gélose hektoén dans un bain marie puis on lui ajoute l'aditif hektoén. Une fois refroidit on la fait écouler dans les boites de pétri en plastique et on la laisse se gélifier pendant quelques minutes avant utilisation directe ou conservation à froid pour quelques jours.

La boite sera incubée dans une étuve à 37°C pour 24 h, au bout de ce temps des colonies de salmonelle vont apparaître sur la surface de la gélose hektoén.

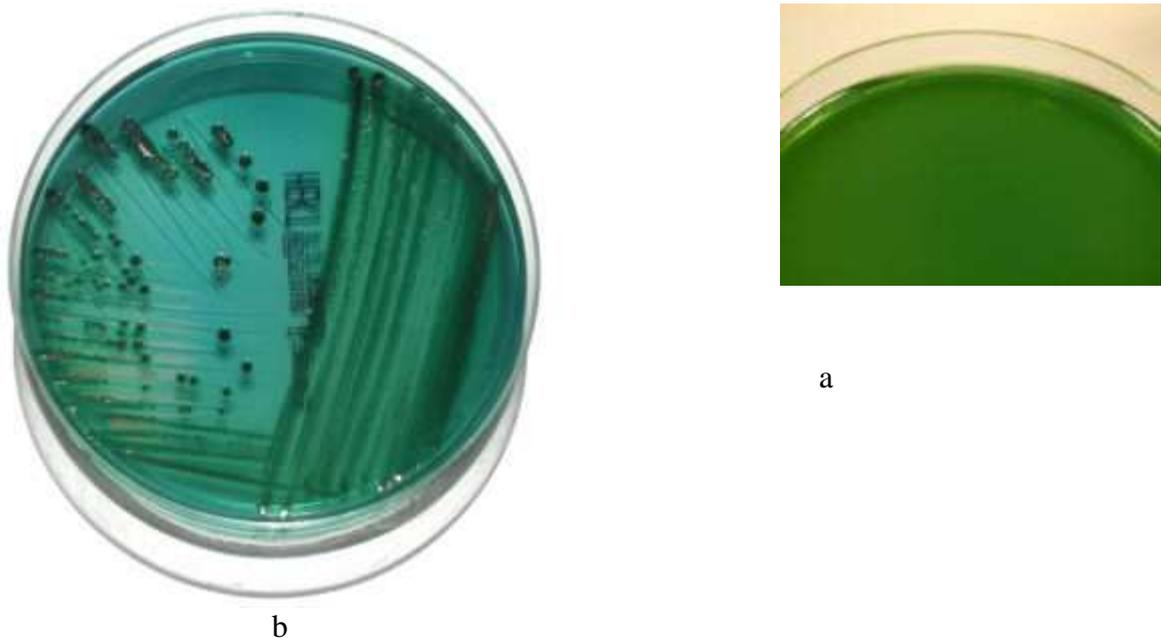


Figure 3-2 : La gélose Hektoen a : avant incubation, b : après incubation

3.3.1.2. Préparation de la suspension de bactéries :

Suivant les recommandations microbiologiques de l'association européenne de saucisse naturelle (European Natural Sausage Casings Association (ENSCA)) la concentration acceptable des entérobactéries et la *S. Aureus* est inférieur à 10^2 bactérie/g et la limite maximale pour les mêmes bactéries est entre 10^3 et 10^4 [126].

Les tests antibactériens dans tous les articles consultés sont effectués pour des suspensions de bactéries qui contiennent entre 10^5 et 10^6 bactérie/ml. Probablement parce que ce n'est qu'à partir de cette concentration que ce genre de bactéries devient dangereux.

Le but ici est de préparer une suspension de bactérie qui contient entre 10^5 et 10^6 bactérie/ml.

Dans un tube à essai qui contient 10 ml d'eau physiologique on met une ou deux colonies de salmonelle (suivant sa taille) à l'aide d'un inoculateur à anse et on mesure l'absorbance de cette suspension à 620 nm.

Il est connu que le spectre UV-VIS des microorganismes et les suspensions des bactéries contiennent des informations quantitatives sur leurs propriétés tel que le nombre, la taille, la forme, la composition chimique, et la structure interne. [127]

Une suspension de bactéries qui a une absorbance entre 0,22 et 0,32 à 620 nm est une suspension qui contient approximativement 10^8 bactérie/ml¹.

Afin d'avoir une suspension moins diluée qui contient entre 10^5 et 10^6 bactérie/ml, celle qui contient 10^8 bactérie/ml a subi une série de dilutions (6 dilutions) comme suit :

1ml de cette dernière est transmis sous des conditions aseptiques dans un autre tube à essai qui contient 9 ml d'eau physiologique. Bien mélanger puis retransmettre 1ml de la suspension de ce deuxième tube à un troisième tube qui contient à lui aussi 9 ml d'eau physiologique, refaire la même procédure jusqu'au sixième tube.

1ml de la sixième suspension est mis dans une boîte de pétri en plastique stérile, on verse dessus environ 25 ml de gélose hektoén, à laisser se gélifier pendant quelques minutes puis on l'incube à 37°C pour 24h .

Au bout des 24h, les bactéries sont visibles sur la surface de la gélose. On les dénombre à l'œil nu, le nombre de bactéries trouvé sera multiplié par le facteur de dilution (10 fois) pour trouver le tube qui contient la suspension voulue et qui sera utilisé par la suite.

3.3.1.3. Préparation et stérilisation des solutions des produits :

Pour préparer des solutions de chitosane et des sept complexes de concentration 1% (ou 10 mg/ml), 0.1g de chaque produit est mis dans 10 ml d'HCl 0.3% (préparé en mettant 1,6 ml d'HCl 37% dans 200 ml d'eau distillée).

A partir de cette solution on a préparé une autre plus diluée de concentration 0,1% (ou 1mg/ml) en mettant 1ml dans 10ml de solvant.

Ces solutions avant chaque usage doivent être mise dans l'autoclave à 121°C pendant 15 à 20 min [71,75,128] afin de les stériliser.

3.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des produits :

L'activité antibactérienne du chitosane et des complexes chitosane-cuivre (II) a été évaluée quantitativement et qualitativement. [139]

3.3.2.1. Evaluation qualitative :

Dans notre travail, les tests qualitatifs sont réalisés par la détermination du taux d'inhibition. [117,130]

La procédure suivie pour la détermination du taux d'inhibition est comme suit :

Dans des tubes à essai qui contiennent 5 ml de bouillon nutritif on a mis 20µl de la solution du produit (le chitosane et chaque complexe à part) de concentration 1%, un autre tube à été réservé uniquement à l'HCl 0,3%.

Dans chaque tube on a ajouté 20 µl de la suspension de bactérie de 10^5 - 10^6 bactérie/ml préparée précédemment. Les neuf tubes seront incubés à 37°C pour 24 h. L'expérience est refaite trois fois.

L'absorbance de chaque solution est mesurée dans des conditions aseptiques à 620 nm avant et après incubation.

Le taux d'inhibition du chitosane et des sept complexes est calculé par l'équation suivante proposée par H. Liu et al [8]

$$\text{Taux d'inhibition} = 1 - \frac{A_{Pr} - A_{Pr0}}{A_{HCl} - A_{HCl0}} \times 100\% \quad (\text{eq 3.4})$$

A_{Pr0} : est l'absorbance du milieu bactérien avec le produit avant incubation

A_{Pr} : est l'absorbance du milieu bactérien avec le produit après incubation

A_{HCl0} : est l'absorbance du milieu bactérien avec la solution d'HCl avant incubation

A_{HCl} : est l'absorbance du milieu bactérien avec le produit après incubation

¹ Cette information ainsi que toute la procédure à suivre pour la préparation de la suspension de bactéries de 10^5 et 10^6 bactérie/ml ont été testés, confirmés et fournis par le laboratoire de microbiologie du CRD SAIDAL d'Alger.

3.3.2.2. Evaluation quantitative :

Ces tests sont réalisés en déterminant les valeurs de :

1-La concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est définie comme la plus faible concentration du produit qui inhibe complètement la multiplication des bactéries après incubation de durée entre 19 et 32h (à négliger une seule colonie ou une faible brume causée par inoculation). [7,128, 130]

2-La concentration minimale bactéricide (CMB) est définie comme étant la plus faible concentration de produit qui tue 99,9% des bactéries. [71]

La CMB est déterminée à partir des tubes utilisés dans la détermination de la CMI en testant la vie des microorganismes présents dans ces tubes et qui ne montrent aucune multiplication. [7,71]

Nos tests quantitatifs sont basés sur la méthode conventionnelle de dilution de bouillon.

3.3.2.2.1. Détermination de la CMI :

Dans notre travail la CMI est déterminée par la méthode de dilution de bouillon (dilution broth method).

Chacun des treize tubes à essai contenant 5 ml de bouillon nutritif est mis dans l'autoclave à 121°C pendant 15 à 20 min. [71]

Au premier tube on ajoute 5 ml de la solution stérile du produit de concentration 0,1%. Bien mélanger puis transmettre 5ml du mélange au deuxième tube et ainsi de suite jusqu'au douzième tube.

De cette façon on aura dans chaque tube la moitié de la quantité de produit qu'il y avait dans le tube avant comme suit :

Tube1 contient 0.1% soit 1mg/ml

Tube2 contient 0.05% soit 0.5 mg/ml

Tube3 contient 0.025% soit 0.25 mg/ml

Tube4 contient 0.0125% soit 0.125 mg/ml

Tube5 contient 0.00625% soit 0.0625mg/ml soit 62.5 µg/ml

Tube6 contient 0.00312% soit 0.0312mg/ml soit 31.2 µg/ml
Tube7 contient 0.00156% soit 0.0156mg/ml soit 15.6 µg/ml
Tube8 contient 0.000781% soit 0.00781mg/ml soit 7.81µg/ml
Tube9 contient 0.000390% soit 0.00390mg/ml soit 3.9 µg/ml
Tube10 contient 0.000195% soit 0.00195mg/ml soit 1.95 µg/ml
Tube11 contient 0.000097% soit 0.00097mg/ml soit 0.97 µg/ml
Tube12 contient 0.0000488% soit 0.000488mg/ml soit 0.488 µg/ml
Le treizième tube est un contrôleur (témoin) (ne contient pas de produit).

Les tubes seront incubés à 37°C pour 24 h puis les bactéries seront dénombrées sous microscope. Le tube qui contient la CMI est celui qui contient la plus faible concentration de produit qui, sous microscope, ne montre aucune bactérie. Les expériences sont refaites trois fois.

3.3.2.2. Détermination de la CMB :

La CMB est déterminée à partir des tubes utilisés dans la détermination de la CMI en testant la vie des microorganismes présents dans ces tubes et qui ne montre aucune multiplication. [7,71]

A l'aide d'un écouvillon, une goutte de chaque tube utilisé dans la détermination de la CMI est transmise et étalée sur la surface d'une gélose hektoén puis incubé à 37°C pour 24h.

La multiplication de ces bactéries prouve l'existence de ces germes dans le tube original. Au contraire, si aucune multiplication n'est observée cela démontre que le tube original ne contient aucune bactérie vivante et le produit est considéré bactéricide à cette concentration. Tous les essais sont refaits trois fois.

3.3.2.3. Analyse statistique des résultats :

A l'aide du logiciel STATITCF, nous avons effectué l'analyse statistique, analyse des variances, de nos résultats obtenus des tests antibactériens.

Quand cette analyse des variances révèle des différences considérables, une comparaison des moyennes à l'aide du test NEWMAN et KEULS permettra de faire un classement des produits testés à un seuil d'erreur de 5%.

Les résultats statistiques sont exprimés par la probabilité (P) qui permet de déterminer le niveau de différence entre les produits testés.

Une probabilité (p) $p < 0.001$: la différence entre les produits est très hautement significative.

Une probabilité (p) $0.001 < p < 0.01$: la différence entre les produits est hautement significative.

Une probabilité (p) $0.01 < p < 0.05$: la différence entre les produits est significative.

Une probabilité (p) $p > 0.05$: la différence entre les produits est non significative.

Le test NEWMAN-KEULS permet de constituer des groupes de traitements homogènes en se basant sur les valeurs des plus petites amplitudes significatives (ppas). [131]

CHAPITRE 4

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

4.1. Extraction de la chitine et sa conversion en chitosane :

4.1.1. Rendement des réactions :

Les résultats de caractérisation montrent que seulement la partie abdominale des carapaces des crevettes rouges contient de la chitine. Les masses de chitine et du chitosane obtenus sont présentées dans le tableau 4.1

Tableau 4.1 : Les masses (g) des carapaces utilisées, la chitine et le chitosane obtenus

partie abdominale	chitine	chitosane
105	20.23	19.64

L'extraction de la chitine a été faite à partir de la partie abdominale avec un rendement de **19.27%**.

Sa conversion en chitosane a eu pour rendement **97.08%** soit un rendement de **18.71%** à partir de la partie abdominale.

Ces résultats sont très acceptables vu que les carapaces des crustacées contiennent entre 14% et 35% de chitine. [37]

4.1.2. Identification de la chitine et du chitosane :

La chitine et le chitosane ont été identifiés par IRTF, analyse élémentaire, et par diffraction des rayons X

4.1.2.1. Identification de la chitine et du chitosane par IRTF :

4.1.2.1.1. Présentation des résultats :

L'analyse des spectres IRTF des deux produits, issus de la partie abdominale et la partie restante des carapaces, montre l'existence de la chitine uniquement dans la partie abdominale des carapaces et c'est cette chitine qui a été désacétylée pour avoir le chitosane. (Figure 4.1 et 4.2).

Les spectres de la chitine, du chitosane, du chitosane contaminé et du chitosane nettoyé sont présentés dans les figures 4.1, 4.3, 4.4 et 4.5, respectivement. Les spectres de la chitine et du chitosane sont très similaires à ceux publiés dans la littérature. [41,47,122,112,132]

A titre comparatif, on présente si après (figures 4.6, 4.7 et 4.8) l'un des spectres IRTF de la chitine et du chitosane qui sont très similaires à notre résultat.

Les spectres IRTF de la chitine et du chitosane avant et après nettoyage présentent les bandes suivantes : (le premier chiffre représente la bande de la chitine les deux chiffres entre parenthèses représentent les bandes de vibration du chitosane et le chitosane nettoyé, respectivement)

- L' α -chitine issu de la partie abdominale des carapaces des crevettes est caractérisée par une bande large avec un sommet intense à 3447 cm^{-1} attribuée aux vibrations d'allongement des groupements hydroxyles (OH) [122] et un autre sommet moins intense à 3266 cm^{-1} attribuée aux vibrations d'allongement des groupements amines (NH).

Dans le spectre du chitosane, la bande de vibration d'allongement des groupements hydroxyle (OH) apparaît comme une large bande à 3448 cm^{-1} et à 3446 cm^{-1} pour le chitosane et le chitosane nettoyé, respectivement. Les bandes amines (NH) apparaissent comme un épaulement à 3276.16 cm^{-1} et à 3276.51 cm^{-1} dans les spectres du chitosane et du chitosane nettoyé, respectivement. [73,133]

Ces bandes majoritaires sont larges et se chevauchent à cause des liaisons hydrogène inter et intramoléculaire. [67,134]

-La bande amide I à 1653 (1657, 1657) cm^{-1} est attribuée aux vibrations de déformation de C=O [135,136], elle est caractéristique de l'unité acétylé du chitosane. [134] (figure 1.2)

-La bande amide II qui correspond à la vibration de déformation des groupements NH et qui apparaît dans le rang de 1640 cm^{-1} à 1550 cm^{-1} comme une forte bande [137] est présente dans les trois spectres comme suit :

- dans le spectre de la chitine deux bandes à 1628 cm^{-1} et à 1554 cm^{-1}
- dans le spectre de la chitosane brut deux bandes à 1625 cm^{-1} et à 1562 cm^{-1}
- dans le spectre de la chitosane nettoyé deux bandes à 1626 cm^{-1} et 1559 cm^{-1}

L'attribution de ces deux bandes d'absorption à la bande amide II est largement reportée dans la littérature. [66,83,135]

-La bande à 1316 cm^{-1} (1317 cm^{-1} , 1316 cm^{-1}) correspond aux vibrations de déformation des groupements CO-NH soit la bande amide III. [49]

-Les deux bandes à 2929 cm^{-1} et à 2961 cm^{-1} dans le spectre IRTF de la chitine sont attribuées aux vibrations d'allongement asymétrique des groupements CH. [83,138]

Dans les spectres du chitosane on n'observe qu'une seule bande à 2923 cm^{-1} et à 2921 cm^{-1} pour le chitosane et le chitosane nettoyé, respectivement. Cette bande est l'une des bandes caractéristiques du chitosane. [7,88,137]

-La bande à 2883 cm^{-1} (2883 cm^{-1} , 2882 cm^{-1}) est associée aux vibrations d'allongement symétrique de CH_2 . [137,139]

-La bande intense à 1074 cm^{-1} (1077 cm^{-1} , 1076 cm^{-1}) est associée aux vibrations d'allongement de C-O du C3 du chitosane (OH secondaire), celle à 1024 cm^{-1} (1029 cm^{-1} , 1027 cm^{-1}) est attribuée aux vibrations d'allongement de C-O de C6 du chitosane (OH primaire). [73]

-La bande à 1423 cm^{-1} (1420 cm^{-1} , 1422 cm^{-1}) est attribuée au vibration de déformation de la liaison CH_2 et à l'orientation des groupements hydroxyle primaires dans le polysaccharide [66] et aux réarrangement des liaisons hydrogène pour avoir l'orientation la plus favorable des groupements OH primaires dans la région amorphe du polysaccharide. [50]

-La vibration de déformation asymétrique du bridge C-O-C apparaît à 1155 cm^{-1} (1155 cm^{-1} , 1155 cm^{-1}). [12,54,73,83,134]

-La bande de vibration de déformation de CH apparaît à 894 cm^{-1} (897 cm^{-1} , 897 cm^{-1}) et la bande de vibration de déformation des groupements amine (NH_2) apparaît à 697 cm^{-1} (611 cm^{-1} , 667 cm^{-1}). Leur présence prouve que ni le cycle glucopyranosique ni les groupements amines n'ont été détruit. [61,82,124,137,138]

-La bande pointue à 1378 cm^{-1} (1379 cm^{-1} , 1378 cm^{-1}) correspond à la déformation symétrique des groupements CH_3 . [61,138]

-la bande à 3107 cm^{-1} (3115 cm^{-1} , 3113 cm^{-1}) est attribuée aux liaisons d'hydrogène intermoléculaire. [140]

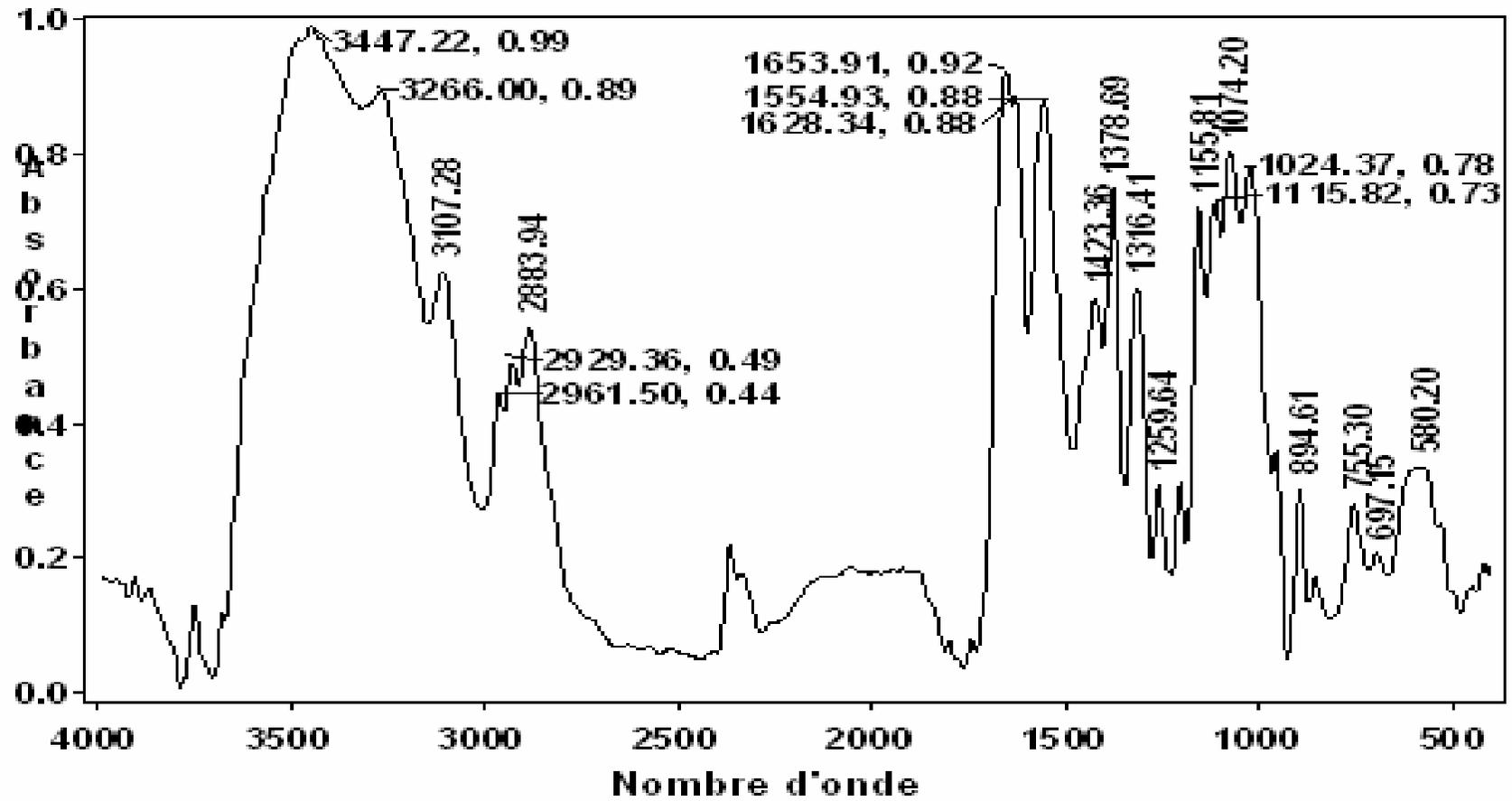


Figure 4.1 : Le spectre IRTF du produit issu de la partie abdominale des carapaces (la chitine)

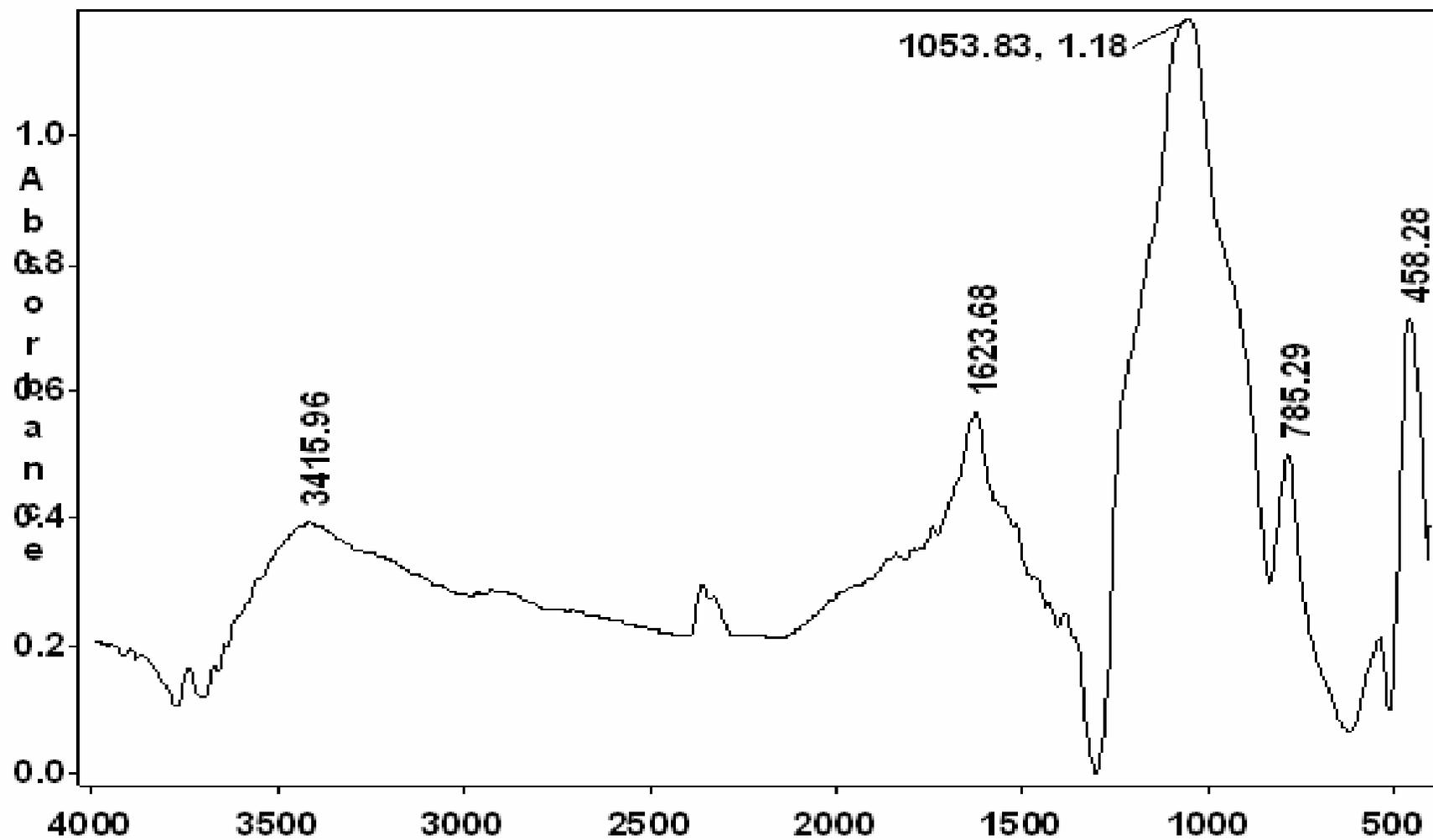


Figure 4.2 : Le spectre IRTF du produit issu de la partie restante des carapaces

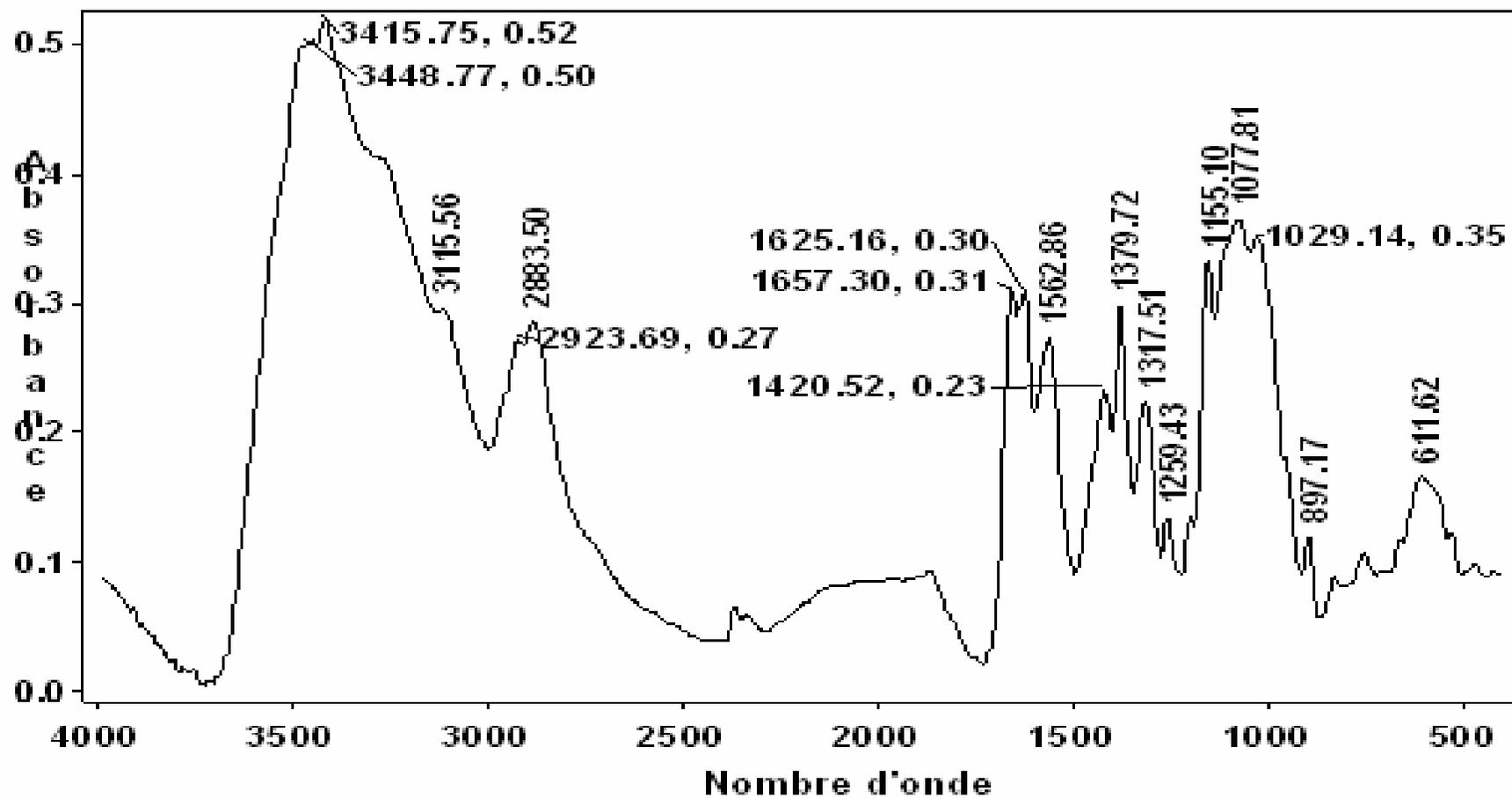


Figure 4.3 : Le spectre IRTF du chitosane

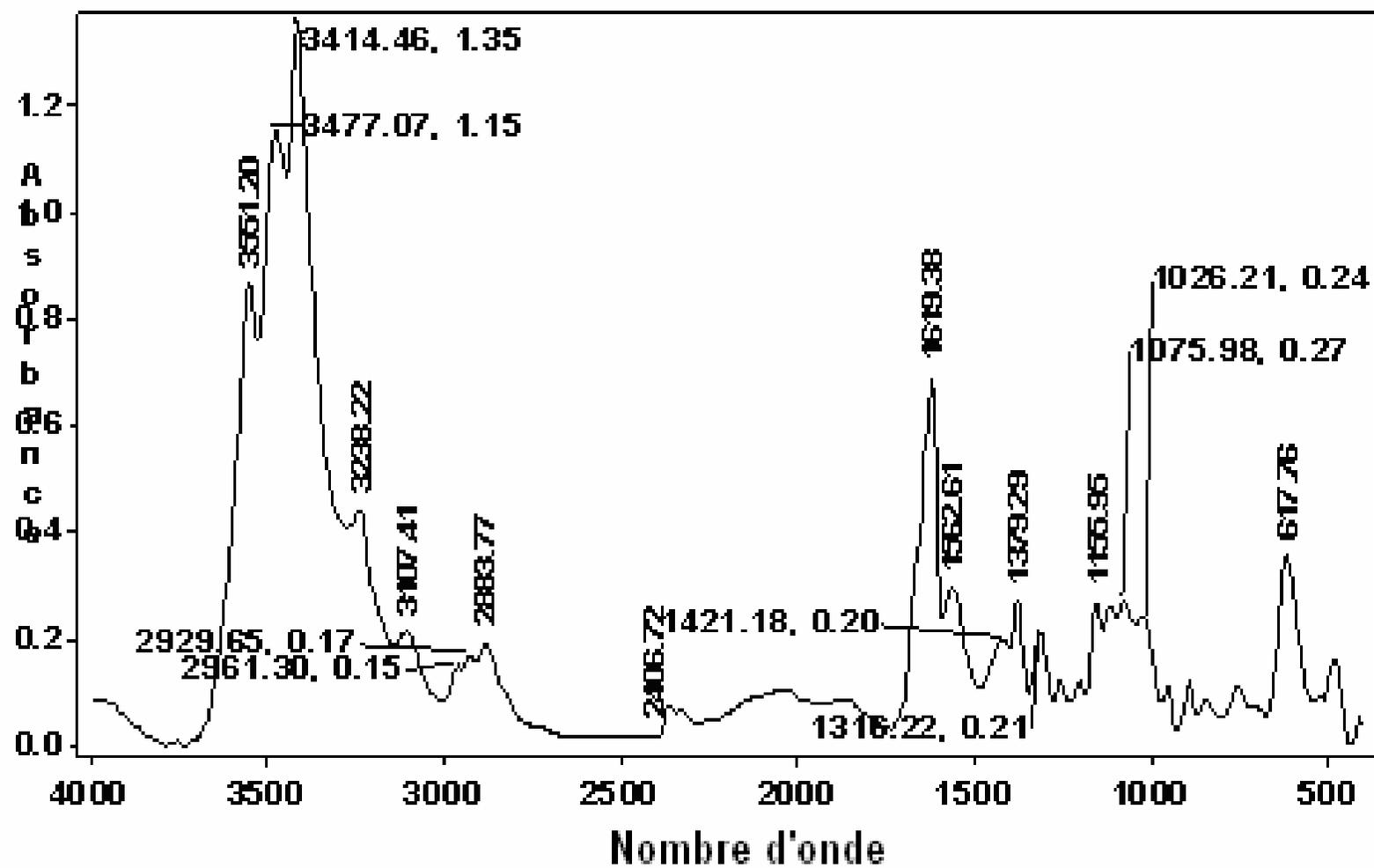


Figure 4.4 : Le spectre IR du chitosane contaminé

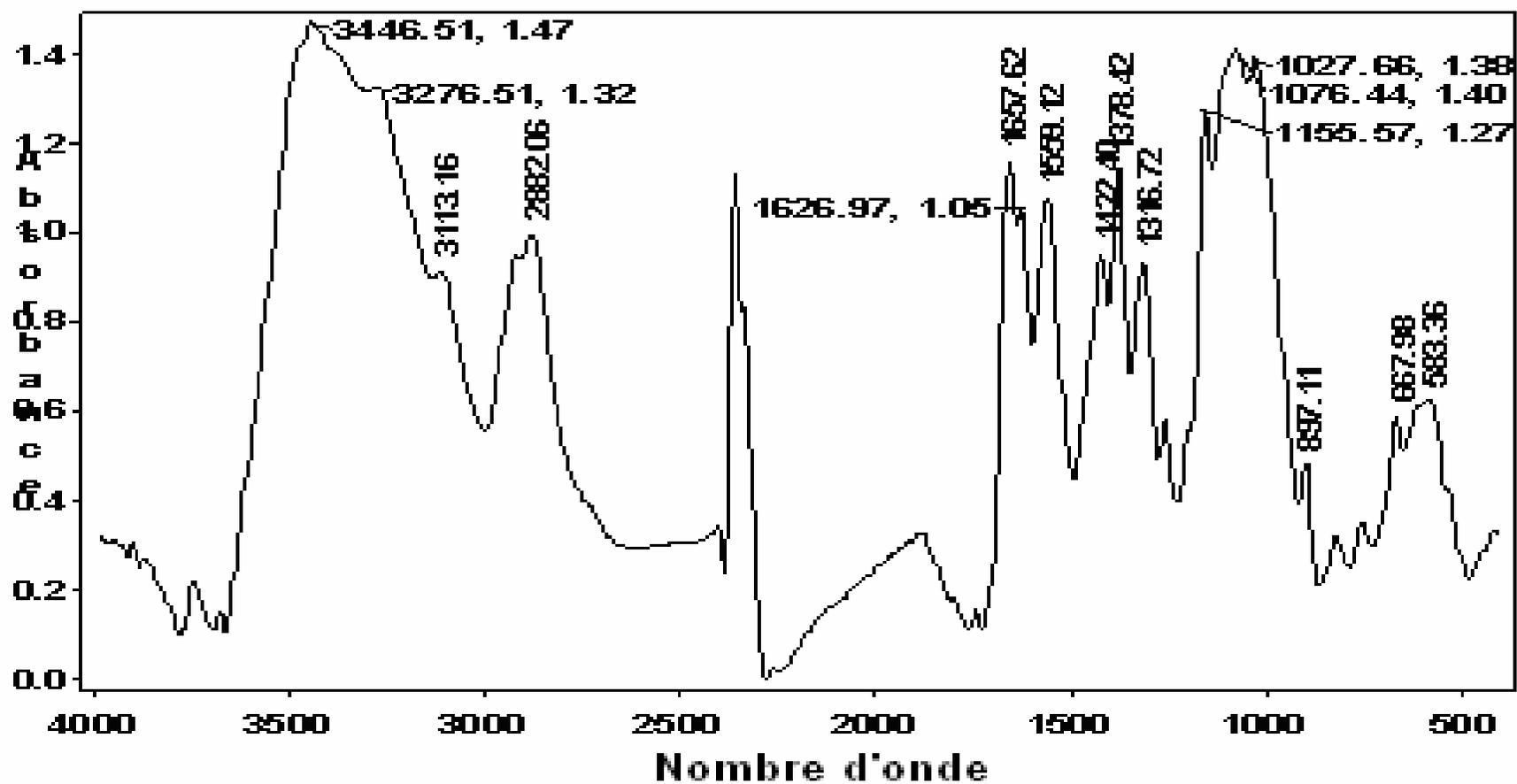


Figure 4.5 : Le spectre IR du chitosane nettoyé

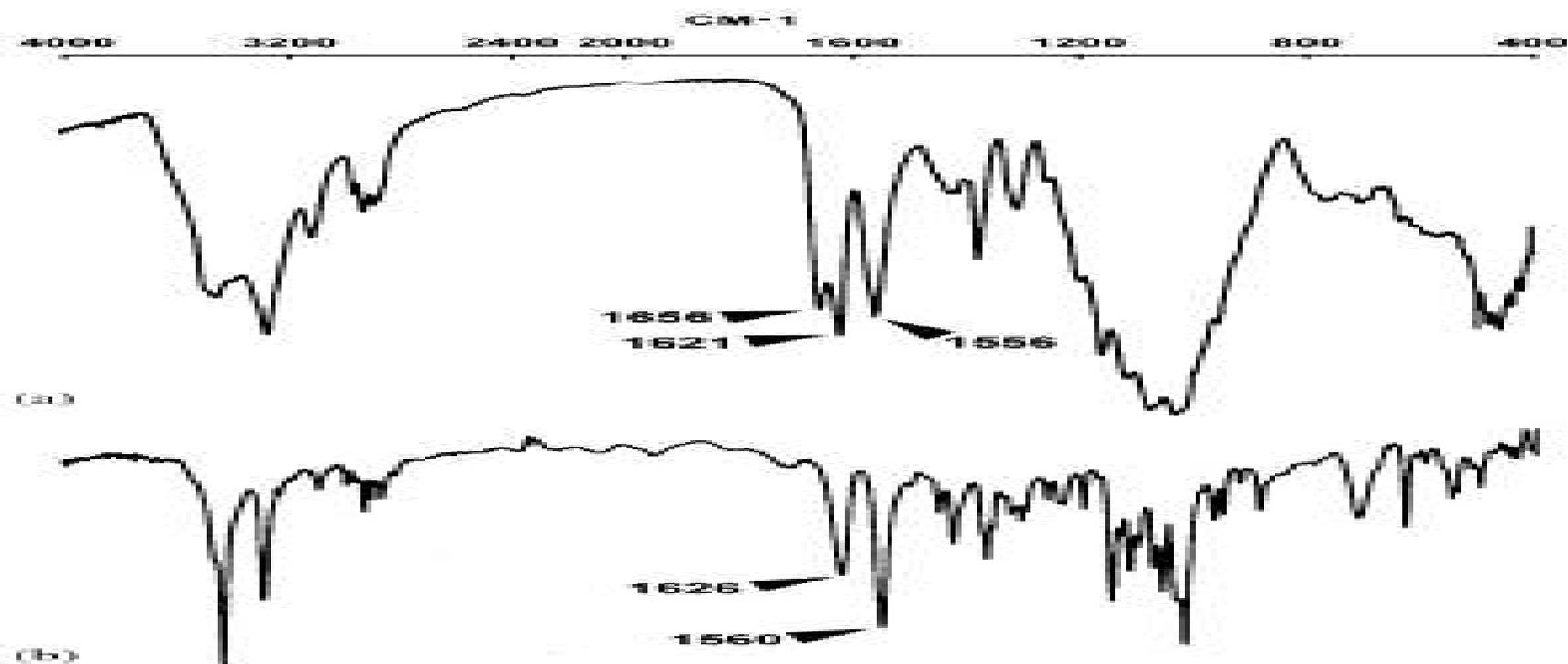


Figure 4.6 : Spectre IRTF de ; a : α -chitine et b : β -chitine [112]

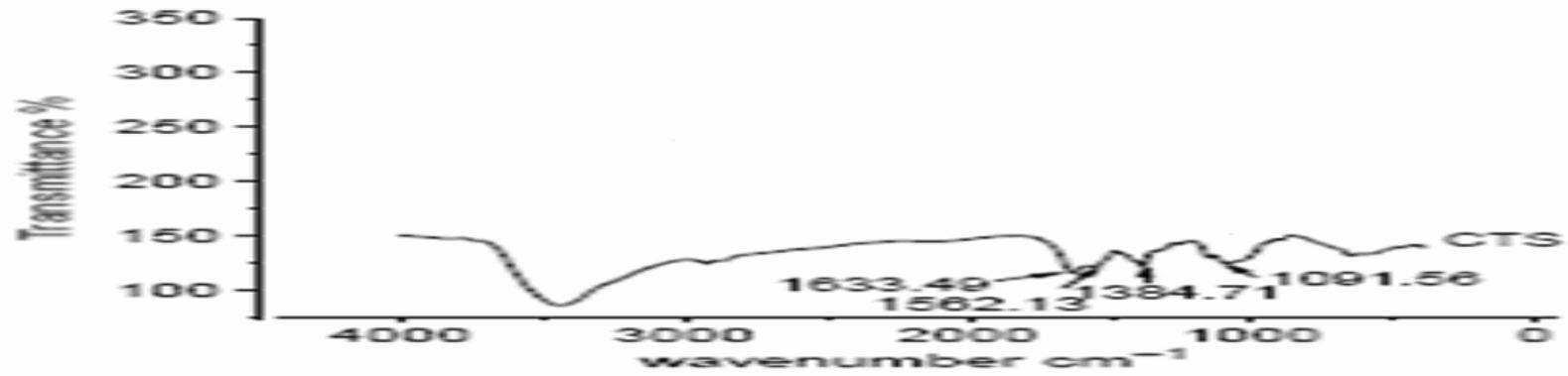


Figure 4.7 : Spectre IRTF du chitosane de DD de 92% préparé à partir des carapaces des crevettes [132]

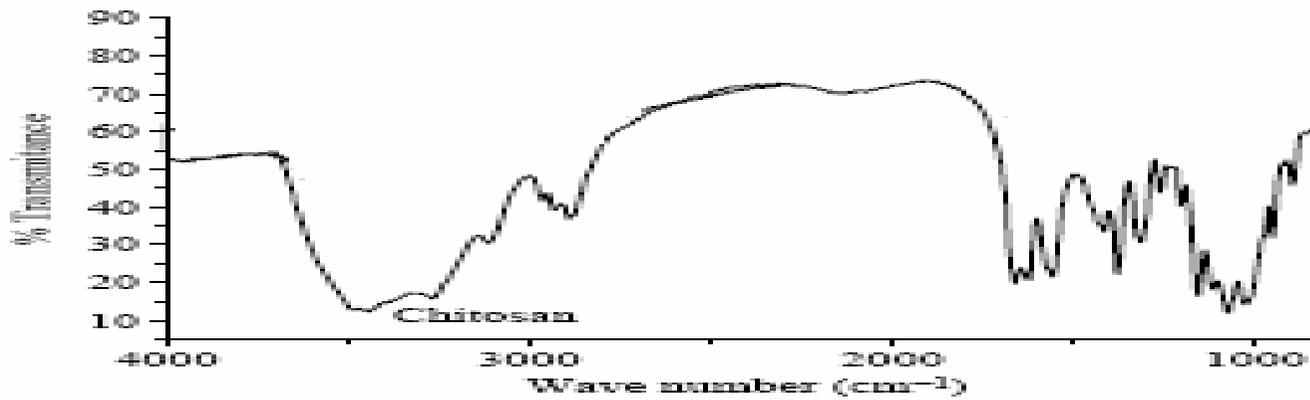


Figure 4.8 : Spectre IRTF du chitosane [47]

4.1.2.1.2. Interprétation des spectres IRTF de la chitine et du chitosane :

La différence principale entre les spectres de la chitine et du chitosane réside dans la région de 1500 à 1700 cm^{-1} [47] (voir figure 4.1, 4. 3 et 4.5)

Dans le spectre de la chitine la bande à 1656 cm^{-1} qui représente le contenu en groupement acétyle (bande caractéristique de la chitine) est intense par rapport à celle à 1628 cm^{-1} qui représente la fraction désacétylée.

Dans le spectre du chitosane, on observe une intensification de la bande à 1628 cm^{-1} par rapport à celle à 1656 cm^{-1} indiquant une désacétylation effective de la chitine. Une désacétylation traduite aussi par le déplacement de la bande amide II présente à 1554 cm^{-1} dans la chitine vers les plus hautes fréquence à 1562 cm^{-1} dans le chitosane [15]. Cette bande n'apparaît qu'en faible intensité dans le spectre du chitosane. [41]

Les bandes d'absorption dans cette zone sont plus intenses dans le spectre de la chitine par rapport à leur voisinage, par contre dans celui du chitosane elles apparaissent avec une intensité modérée. C'est une allure est présente aussi dans les spectres de la chitine et du chitosane publiés. [41,47]

Quand les deux bandes à 3448 cm^{-1} et 3415 cm^{-1} qui représentent ν_{OH} et ν_{NH} apparaissent avec une certaine intensité, on observe deux bandes à 1625 et 1657 cm^{-1} [47], c'est le cas pour le spectre du chitosane.

Plusieurs publications ont reporté d'après Brugnerotto [136] que les bandes caractéristiques du polysaccharide sont celles à 1155 ($1155, 1155$) cm^{-1} (ν_{COC}), 1074 ($1077, 1076$) cm^{-1} (ν_{CO} de C3), 1024 ($1029, 1027$) cm^{-1} (ν_{CO} de C6) et à 894 ($897, 897$) cm^{-1} (δ_{CH}). [7,82]

La présence de ces bandes dans les trois spectres indique la nature polysaccharide des trois produits. [7,88]

L'absence d'une bande autour de 3500 (c'est le cas dans les trois spectres) indique la participation des groupements OH du C3 (OH secondaire) et $-\text{CH}_2\text{OH}$ du C6 (OH primaire) dans les liaisons hydrogène inter et intramoléculaire et donc l'absence de groupements OH libres. [50]

Le déplacement de la bande présente au dessus de 3000 cm^{-1} (à 3266 cm^{-1} dans le spectre de la chitine) vers les plus hautes fréquences dans le chitosane (à 3415 cm^{-1}) indique l'augmentation de l'ordre dans la structure du chitosane. [50] Une haute cristallinité du produit est traduite aussi par la présence d'une bande pointue à 611 cm^{-1} . [141]

La bande de vibration d'allongement des groupements OH et NH présente dans le spectre du chitosane avant nettoyage sont fortement chevauchées puisqu'elles apparaissent comme une forte bande à 3448 cm^{-1} (ν_{OH}) avec un petit épaulement à 3276.16 cm^{-1} (ν_{NH}). Après nettoyage, ces deux bandes sont moins chevauchées puisque la bande ν_{NH} apparaît sous forme d'un palier bien visible à 3276 cm^{-1} .

Cette diminution de chevauchement peut être expliquée par la réduction des liaisons hydrogène inter et intramoléculaire [67,134] comme conséquence du traitement de nettoyage qu'a subi le chitosane avant la réaction de complexation. Ce changement structurel affecte l'allure et l'emplacement des bandes amide I et amide II dans le spectre du chitosane nettoyé et implique la modification de l'arrangement des liaisons d'hydrogène et la structure cristalline du chitosane. Une modification cristalline traduite aussi par le déplacement et le changement d'allure de la bande de vibration de déformation des groupement amine δ_{NH_2} située à 611 cm^{-1} [141] dans le chitosane brut vers les plus hautes fréquences à 667 cm^{-1} [134] dans le chitosane nettoyé.

4.1.2.2. Identification par analyse élémentaire :

Les résultats de l'analyse élémentaire de la chitine et du chitosane sont présentés dans le tableau 4.2

Tableau 4.2 : Pourcentages expérimentaux et calculés (entre parenthèse) du carbone, hydrogène, et d'azote dans la chitine et le chitosane.

Le produit	C%	H%	N%
chitine	40.72 (47.28)	5.236 (6.45)	5.012 (6.89)
chitosane	38.79 (44.76)	5.331 (6.89)	5.720 (8.7)

Les résultats expérimentaux sont relativement en accord avec les pourcentages calculés. Les pourcentage CHN théoriques sont calculés pour une chitine totalement acétylée et un chitosane totalement désacétylé. Pour une chitine de DA de 100% extraite à partir des crevettes roses le pourcentage de carbone expérimental est de 44.74% et le pourcentage d'azote expérimental est de 6.36%. [33]

Pour nos produits, la chitine est 78.31% désacétylé et le chitosane est 85,94% désacétylé ce qui explique, peut être, la légère différence entre les résultats expérimentaux et les valeurs calculées.

4.1.2.3. Identification par la DRX :

La chitine et le chitosane sont des formes polymorphiques qui se produisent dans la forme α - à partir des crevettes et des crabes. [43]

Les diffractogrammes montrent cinq réflexions cristallines observées pour 2θ dans le rang de 5- 40°. (Figures 4.9 et 4.10 respectivement)

Les deux pics de diffractions les plus intenses et les plus larges sont situés au tour de 2θ de 10° et 20°, ce qui est en accord avec la littérature. [41,43,66,107,142]

Dans le diffractogramme du chitosane, l'intensité du pic de diffraction au tour de 20° (qui est le pic le plus intense) est faible par rapport à celle du même pic dans le diffractogramme de la chitine.

Y. Zhang et al [43] explique ce fait par l'augmentation du degré de désacétylation. (DD de la chitine est de 78% et DD du chitosane est de 85%).

Ce pic se déplace vers des angles les plus hauts dans le diffractogramme du chitosane. Tandis que, le second pic d'un point vu intensité qui est situé au tour de 10° garde le même emplacement. Ce résultat est en accord avec l'étude de Y. Zhang et al [43]

D'autre part, la diminution de l'intensité de réflexion au tour de 20° indique aussi la diminution du nombre des groupements acétamides avec une structure moins ordonnée. Ce qui confirme les données du spectre IRTF du chitosane. [66]

Malgré le changement de cristallinité observé entre la chitine et le chitosane, les deux diffractogrammes sont très semblables ce qui confirme la désacétylation partielle de la chitine préparée et donc confirme la valeur de DD donnée par l'analyse élémentaire.

4.1.3. Détermination du degré de désacétylation :

Le degré d'acétylation (DA) est définie comme étant la fraction molaire des unités acétylées (unité acétyl glucosamine). Le degré de désacétylation (DD) est définie comme étant la fraction molaire des unités désacétylées (unité glucosamine). [43]

DA de la chitine a été déterminé par analyse élémentaire. DD du chitosane a été déterminé par IRTF et par titrage potentiométrique.

4.1.3.1. Détermination du DA de la chitine :

Les résultats de l'analyse élémentaire présentés dans le tableau. 4.3 montrent que pour la chitine N% est de 5.012 et C% est de 40.72, donc DD est de 78.31% soit DA de 21.69%.

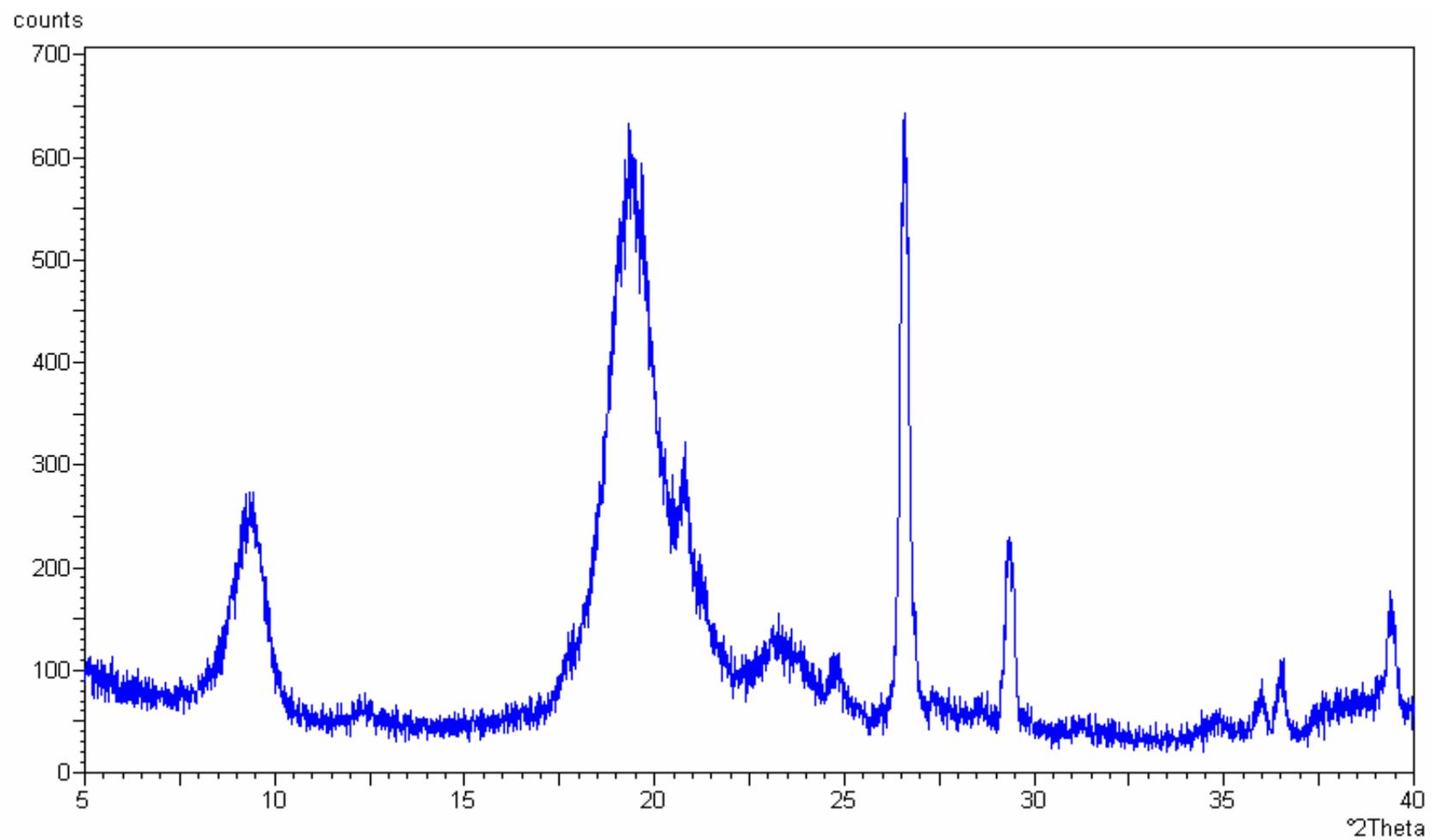


Figure 4.9 : Le diffractogramme de la chitine

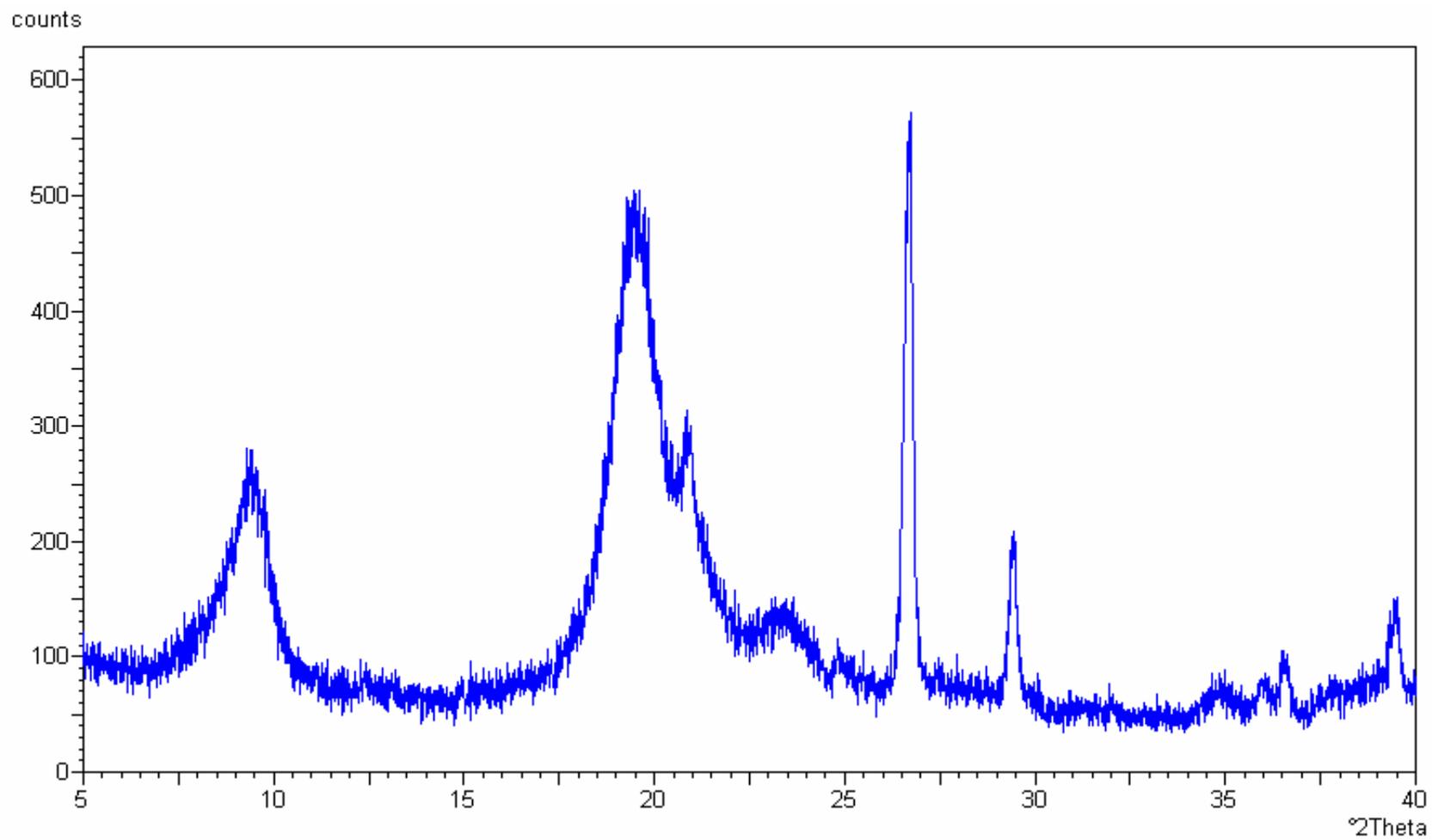


Figure 4.10 : Le diffractogramme du chitosane

4.1.3.2. Détermination du DD du chitosane :

4.1.3.2.1. Détermination du DD par IRTF :

Les valeurs de l'absorbance de quelques bandes sont utilisées dans la détermination du DD puisqu'elles sont proportionnelles à la concentration (la loi de Beer-Lambert).

Cela n'est applicable que pour les spectres là où la proportionnalité concentration / absorbance est vérifiée (quand l'absorbance A est suffisamment basse ; bien au dessous de 1). [56]

La détermination du DD ou DA ($DD = 1 - DA$) a été reportée par plusieurs auteurs, elle est basée sur la comparaison entre l'absorbance d'une bande qui est proportionnelle à la désacétylation (bande de mesure) à l'absorbance d'une autre bande qui est indépendante de la désacétylation (bande de référence). [56,57,63]

Notre chitosane est trouvé être **85,94%** désacétylé

4.1.3.2.2. Détermination du DD par titrage potentiométrique :

Le degré de désacétylation est calculé en comparant entre le nombre des groupements amines libres (par unité de poids de l'échantillon) et le poids de l'unité glucosamine [122]. Ce qui nous conduit à l'équation de M.R. Avadi et al [71] (l'équation 3.3).

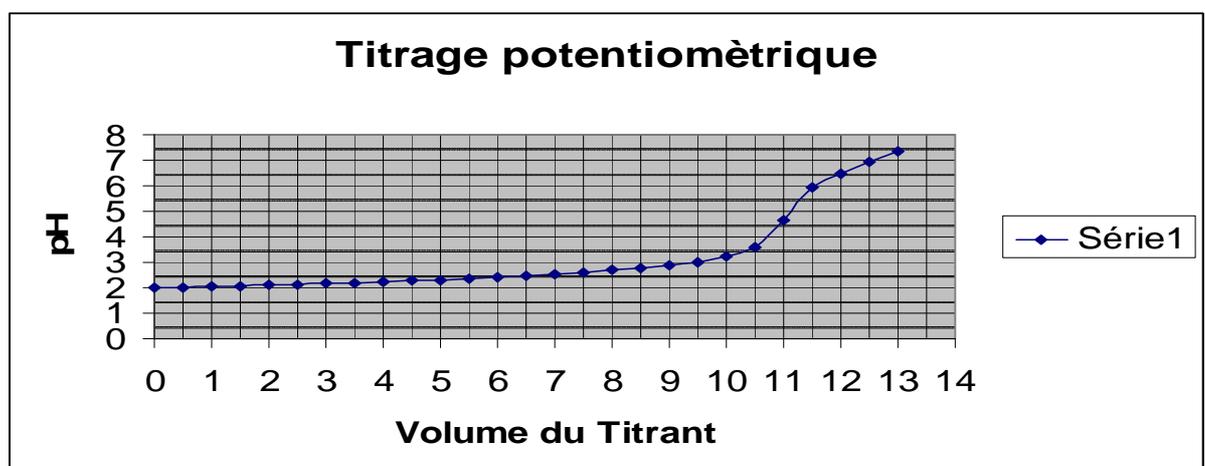


Figure 4.11 : Variation du pH en fonction du volume de NaOH

La figure 4.11 montrent que $y = 10$ ml et $x = 12$ ml.

A partir de cette méthode, le degré d'acétylation est trouvé être égale à 14.35 d'où DD est égale à **85.65** qui est une valeur proche de celle déterminée par IR (**85,94%**).

4.1.4. Mesure de la viscosité et détermination du poids moléculaire du chitosane:

Le poids moléculaire viscosimétrique moyen a été calculé en utilisant l'équation de Marc-Houwink. A partir de la droite $\eta_{sp} / c = f(c)$ (figure 4.12), La viscosité intrinsèque $[\eta]$ est trouvée être égale à 2,83 dl/g soit 283 ml/g, d'où le poids moléculaire viscosimétrique moyen est de 384647 g/mol soit environ 385 KDalton

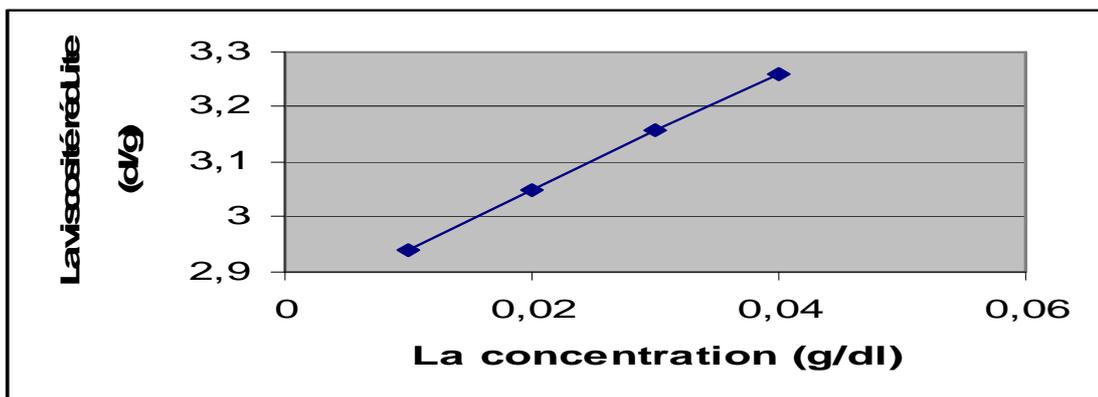


Figure 4.12 : Détermination de la viscosité intrinsèque par la méthode de Huggins

4.2. Identification des complexes :

Les masses des complexes formés sont données dans le tableau 4.3

Les sept complexes ont été identifiés par spectrométrie IRTF, la spectrophotométrie UV-VIS et SAA, et par analyse élémentaire. Les complexes 6 et 7 ont été caractérisés par la DRX.

Tableau 4.3 : Les masses des complexes formés à partir de 0.5 g de chitosane

complexe	masse (g)
complexe1 (1 : 1)	0.751
complexe2 (1 : 2)	0.62
complexe3 (1 : 3)	0.62
complexe4 (1 : 4)	0.62
complexe5 (2 : 1)	1.213
complexe6 (3 : 1)	1.393
complexe7 (4 : 1)	1.688

4.2.1. Identification des complexes par IRTF:

La première examinations des spectres des complexes chitosane-cuivre nous conduit à les classer en quatre groupes selon leur ressemblance d'allure.

Le premier groupe regroupe les complexes 5, 6 et 7 (figures 4.13, 4.14, 4.15, respectivement).

Le deuxième pour le complexe 1 (figure 4.16).

Le troisième pour les complexes 2 et 3 (figure 4.17 et 4.18, respectivement) et le quatrième pour le complexe 4 (figure 4.19).

Les points communs qui relient les spectres IRTF de tous les complexes sont :

1- le déplacement de la bande δ_{NH} vers les plus grandes fréquences dans tous les complexes indiquant la participation des groupements amines dans la complexation du cuivre dans tous les complexes formés.

2- L'apparition de nouveaux petits pics situés dans la zone de faible fréquence entre 540 et 420 cm^{-1} , ces pics sont attribuées aux vibrations d'allongement des liaisons Cu-O et Cu-N [11,29]

3- la quantité de cuivre complexée (liée) avec le polymère est en relation directe avec la diminution de l'intensité et l'emplacement des bandes OH et NH. [21]

Les différences observées entre ces spectres reflètent un taux de complexation et une structure différente entre les quatre groupes. Voici une interprétation des spectres IRTF pour chaque groupe à part.

4.2.1.1. Interprétation des spectres du premier groupe (complexes 5, 6 et 7) :

Les spectres IRTF des complexes 5 (2 :1) ,6 (3 :1) et 7 (4 :1) (figures 4.13, 4.14, 4.15, respectivement) indiquent la complexation des ions de cuivre par le chitosane à travers les faits suivants :

1-la disparition de la bande δ_{OH} associée aux liaisons d'hydrogène à 3113 cm^{-1} et celle due à la vibration d'allongement des groupements CH_2 à 2882 cm^{-1} et l'allongement des groupements CH à 2921 cm^{-1} . Avec l'apparition d'une bande au dessus de 3500 cm^{-1} tout à côté de celle de l'allongement vibratoire des groupements OH mais avec une intensité très réduite par rapport au spectre du chitosane nettoyé.

Cela indique que les interactions de type liaison d'hydrogène inter et intramoléculaire sont très faible et probablement absentes complètement à cause de l'implication des groupements OH dans la complexation de cuivre.

2- La disparition des bandes de vibration d'allongement des groupements $C-O$ de $C3$ (OH secondaire) et la réduction très importante et remarquable de l'intensité de la bande d'allongement des groupements $C-O$ du $C6$ à côté de son déplacement vers les plus hautes fréquences (voir le tableau. 4.7), indiquent leur engagement dans des liaisons de coordination avec le cuivre.

3- La présence des bandes δ_{CH} à 885 cm^{-1} et δ_{NH_2} à 676 cm^{-1} légèrement déplacé par rapport à ceux du chitosane nettoyé du fait de la complexation (voir le tableau. 4.7), prouve que le cycle pyranosique n'est pas détruit et que les groupements amines sont impliqués dans la complexation. [134]

4- La presque disparition et le déplacement des bandes amide I et amide II qui sont caractéristiques des groupements acétyl et amine, respectivement traduit non seulement l'engagement des groupements NH_2 dans la complexation des ions de cuivre mais aussi l'implication des groupements OH du C3 et C6 dans la complexation.

5- La disparition de la bande du bridge peut être expliquée par la dépolymérisation de la chaîne du chitosane à cause de l'engagement de l'unité glucosamine dans la formation des liaisons de coordination qui sont des liaisons fortes capable d'affaiblir jusqu'à détruire les liaisons C-O-C du bridge. [12]

4.2.1.2. Interprétation du spectre du deuxième groupe (le complexe1) :

Le spectre du complexe 1 (figure 4.16) est un spectre intermédiaire entre les spectres du premier groupe d'une part et les deux autres groupes d'autre part, il est caractérisé par :

1- L'apparition d'une bande au dessus de 3500 cm^{-1} (à 3512 cm^{-1}) indiquant que les interactions de type liaison hydrogène inter et intramoléculaire sont très faible. [47,66]

2- La modification remarquable de l'intensité de la bande d'allongement vibrationnel des groupements CH_2 (à 2886 cm^{-1}) par la diminution de son intensité devant celle attribuée aux vibrations d'allongement des groupements CH (à 2929 cm^{-1}) indique le changement de l'environnement des groupements $-\text{NH}_3^+$. [143]

3- Le déplacement de la bande de vibration de déformation des groupements CH_2 vers les plus basses fréquences, indique un arrangement différent des groupements hydroxyles primaires et la modification de l'environnement des groupements CH_2OH . [50]

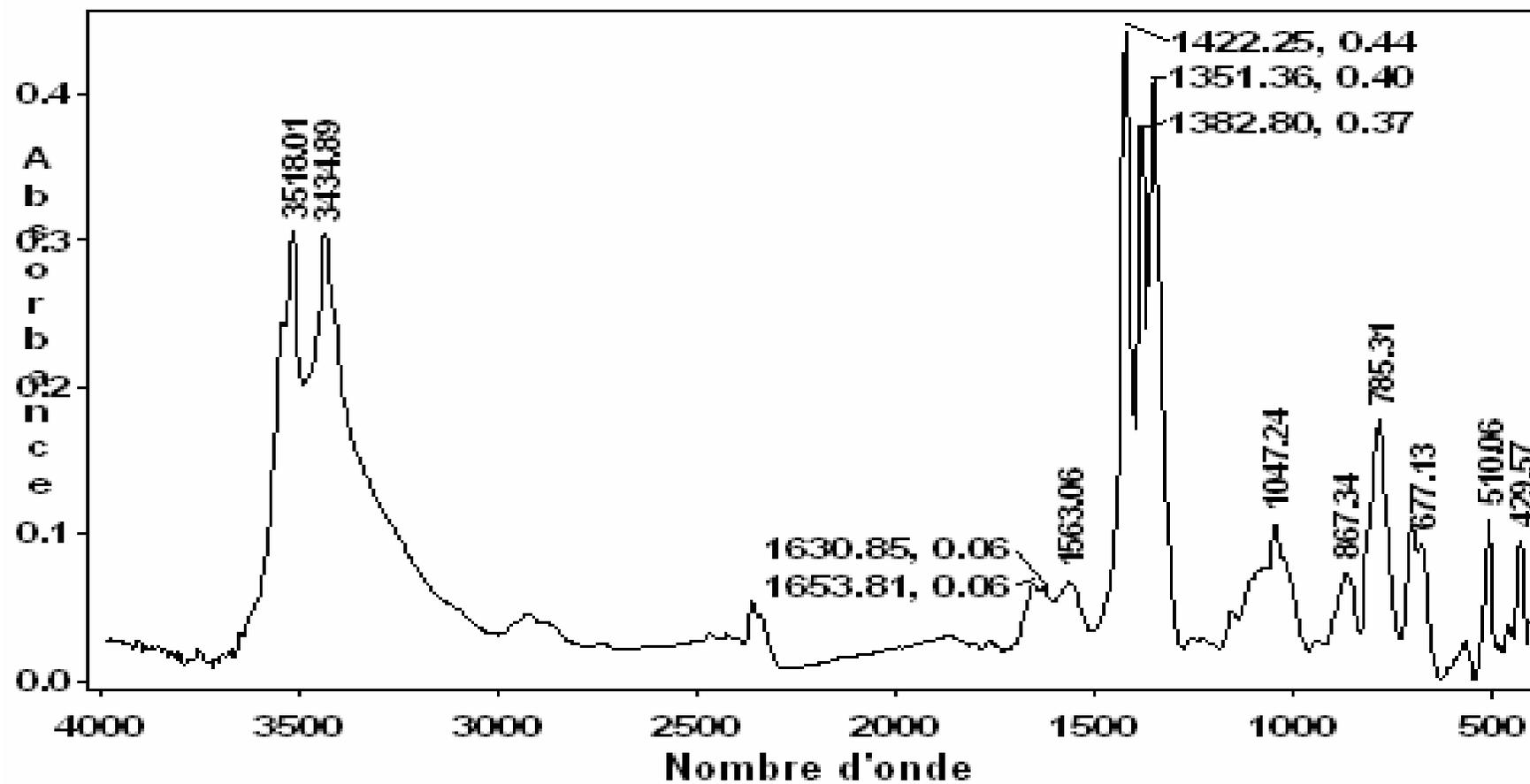


Figure 4.13 : Le spectre IR du complexe 5 (2 : 1)

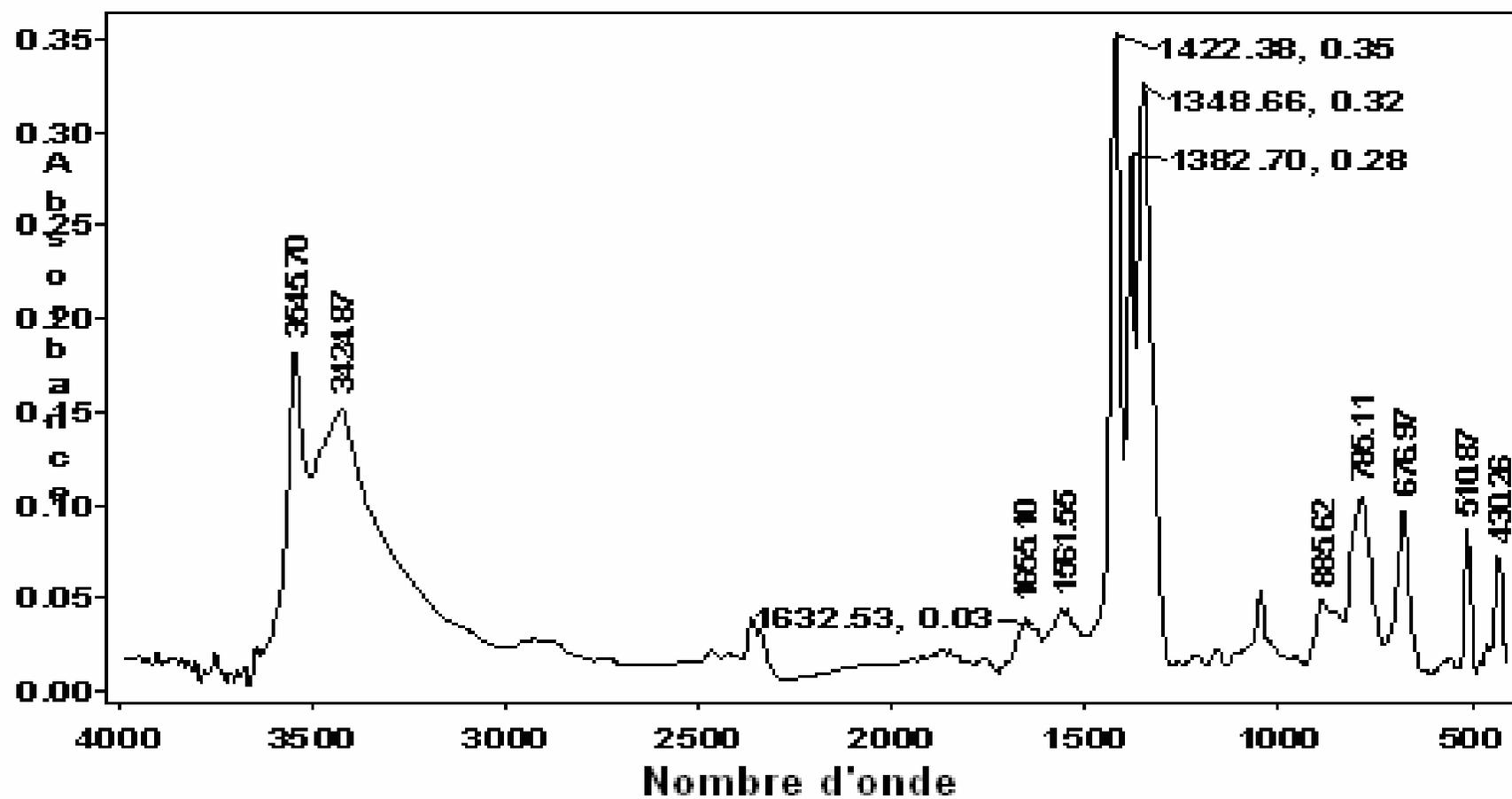


Figure 4.14 : Le spectre IR du complexe 6 (3 : 1)

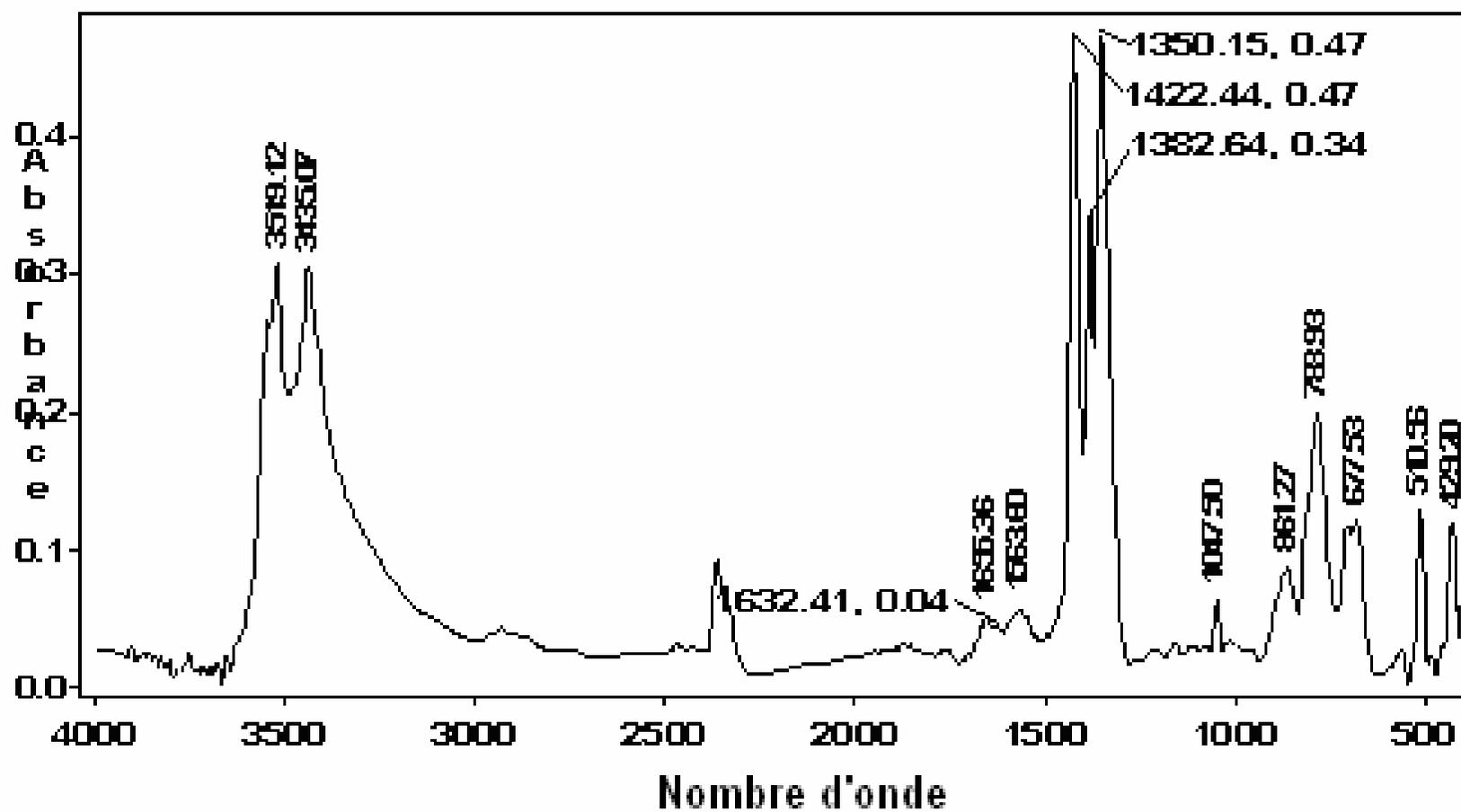


Figure 4.15 : Le spectre IR du complexe 7(4 : 1)

4- L'apparition de la bande ν_{COC} à 1156 cm^{-1} montre que la chaîne polymérique du chitosane n'est pas détruite, mais son déplacement prouve l'interaction chitosane-cuivre dans ce complexe.

5- La diminution de l'intensité et le déplacement de la bande à 1655 cm^{-1} (amide I) traduit l'implication des unités acétylglucosamine dans la complexation de cuivre à côté des unités glucosamines

4.2.1.3. Interprétation des spectres du troisième groupe (complexes 2,3)

Ces spectres montrent dans leur ensemble une complexation des ions de cuivre moins importante que celle présentée par les complexes du premier groupe. Cela est dû au rapport molaire cuivre : unité glucosamine employé et par conséquent à la quantité de cuivre présente dans la solution lors de la formation des complexes.

Les spectres IR des complexes 2 et 3 (figures 4.17 et 4.18) sont caractérisés par :

1- Les bandes d'allongements vibrationnels des groupements OH et NH sont chevauchées dans le spectre IRTF du chitosane employé. Son interaction avec le cuivre conduit au dévoilement de la bande NH [73] qui apparaît à côté de celle de OH. Ce dévoilement est probablement dû à une affectation des liaisons d'hydrogène par la réaction de complexation de cuivre. [47,66]

2- La modification remarquable de l'intensité de la bande d'allongement vibrationnel des groupements CH_2 (à 2886 cm^{-1}) par la diminution de son intensité devant celle attribuée aux vibrations d'allongement des groupements CH (à 2929 cm^{-1}). Ce fait est causé par la diminution du nombre des groupements $-\text{NH}_3^+$. [143]

Le déplacement de la bande de vibration de déformation des groupements CH_2 vers les plus basses fréquences, indique un arrangement différent des groupements hydroxyles primaires et la modification de l'environnement des groupements CH_2OH . [50]

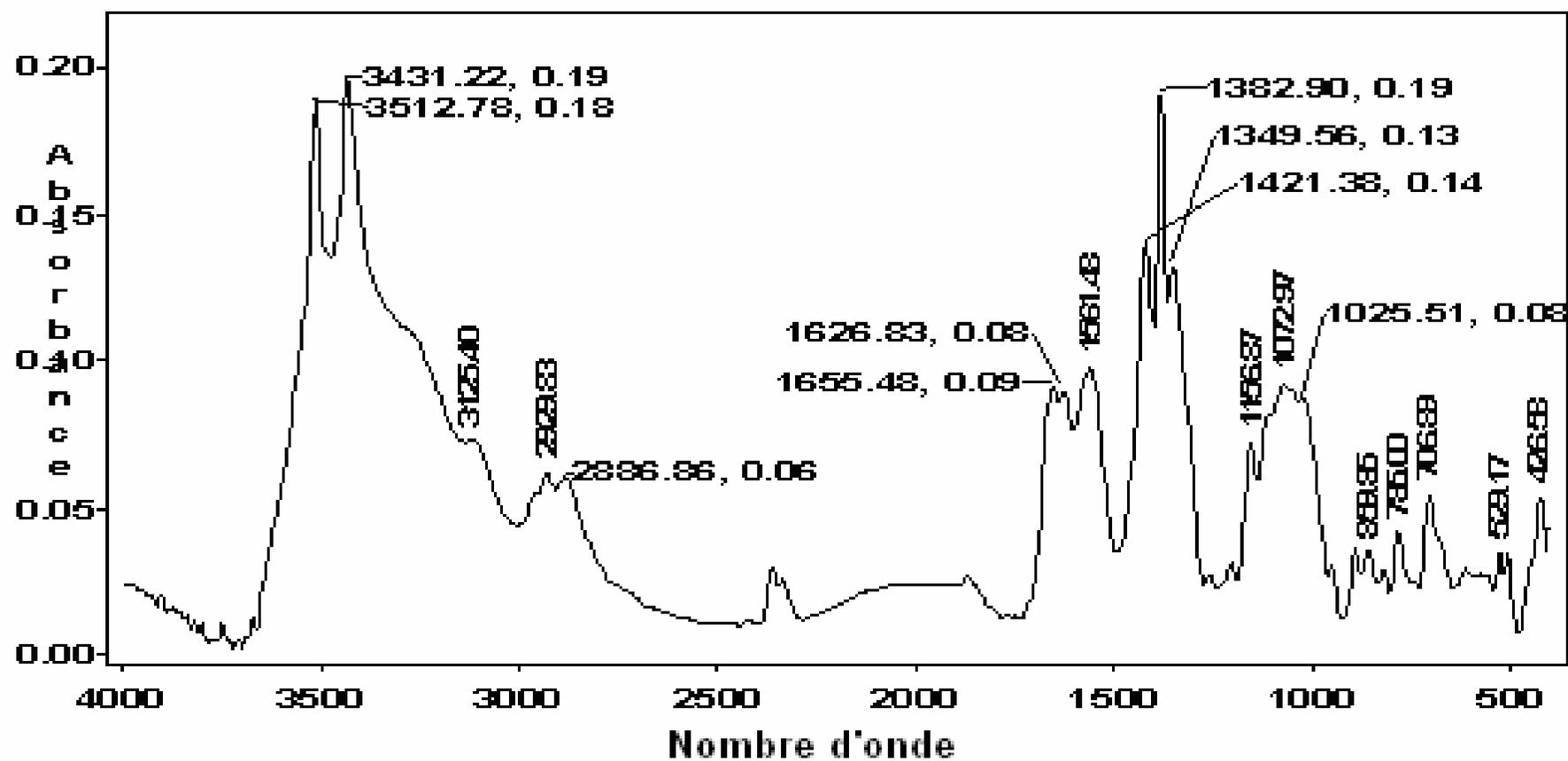


Figure 4.16 : Le spectre IRTF du complexe 1 (1 : 1)

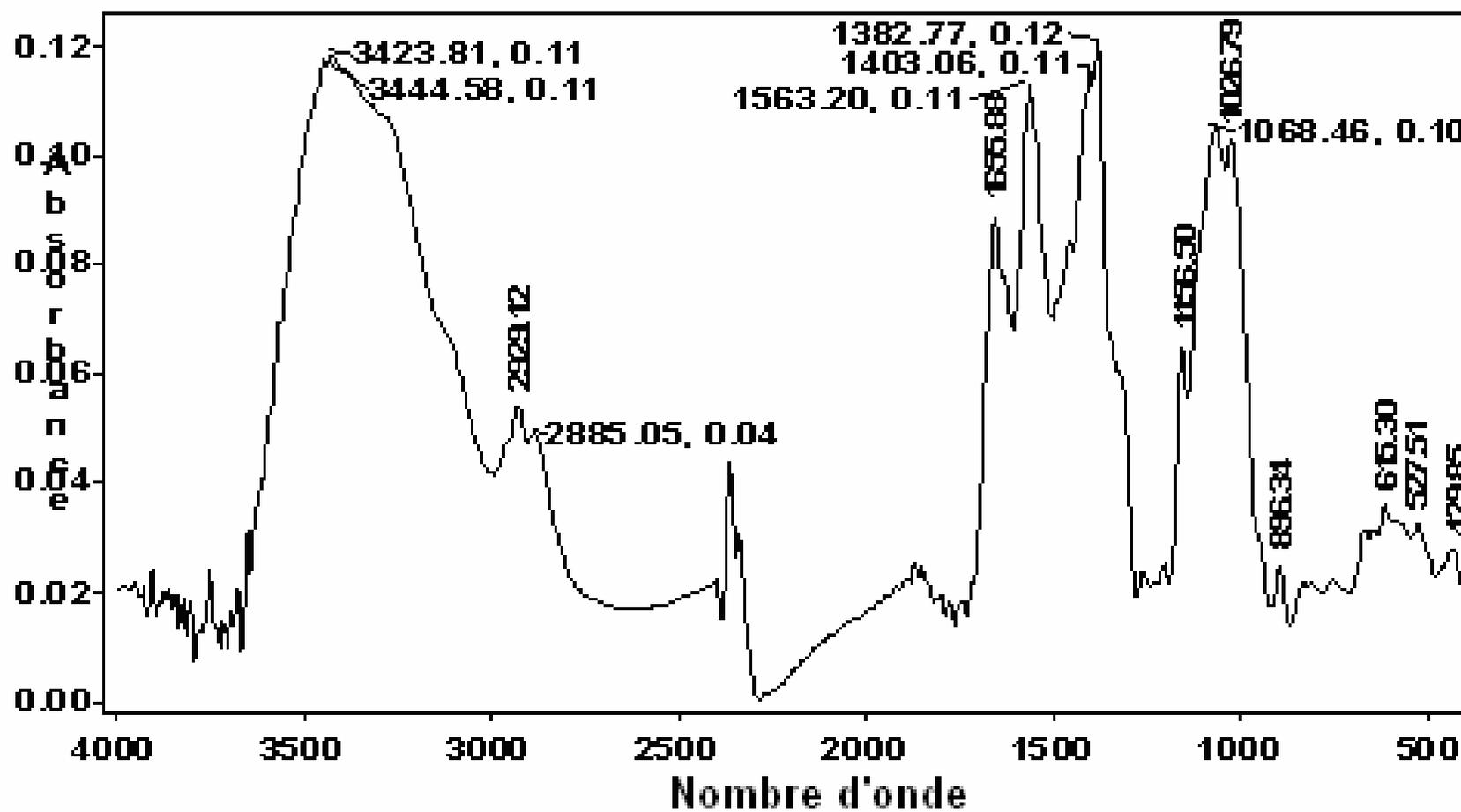


Figure 4.17 : Le spectre IRTF du complexe 2 (1 : 2)

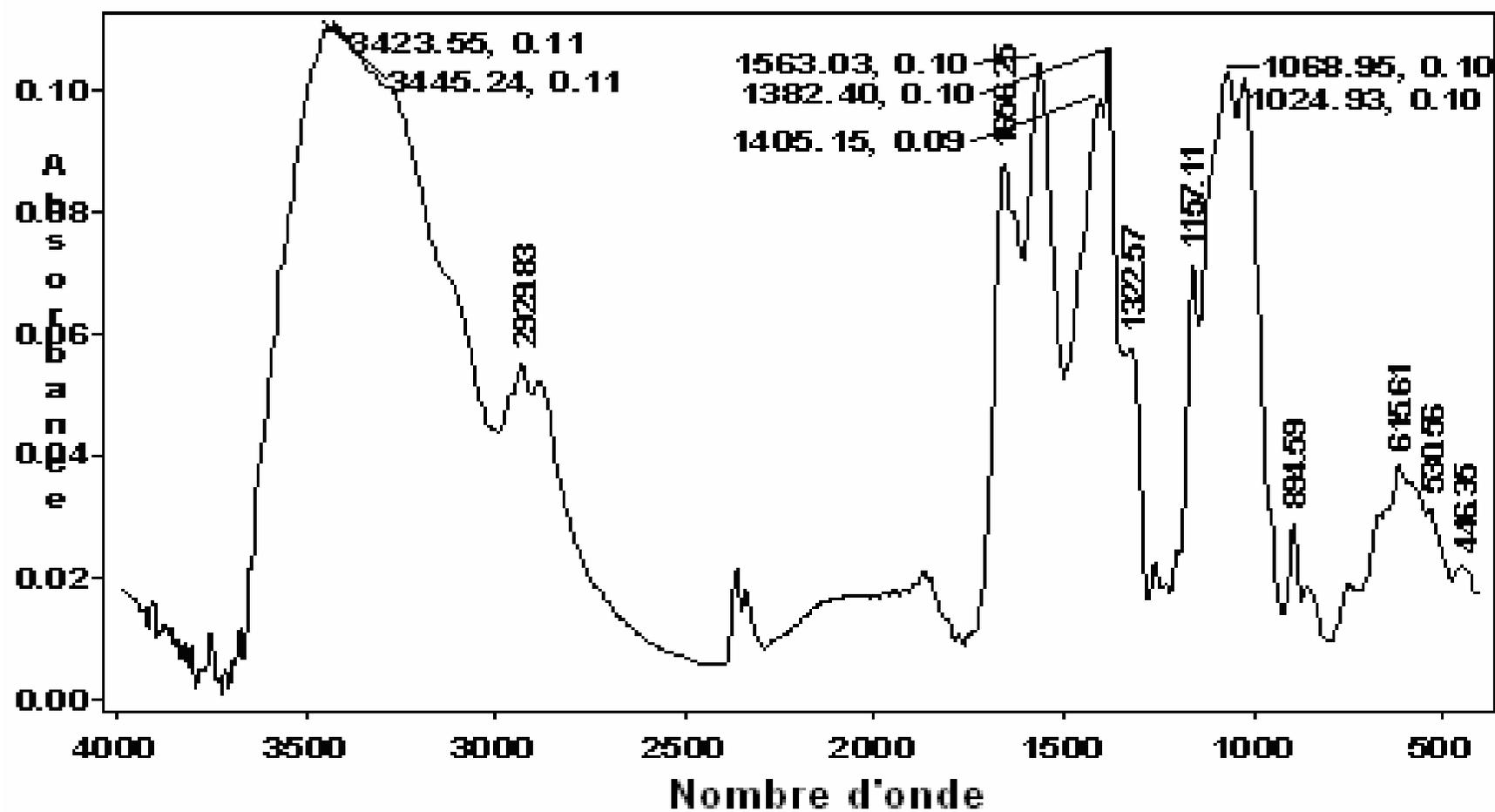


Figure 4.18 : Le spectre IRTF du complexe 3 (1 : 3)

3- La diminution de l'intensité et le déplacement de la bande à 1656 cm^{-1} (amide I) traduit l'implication non seulement des groupements amines dans la complexation de cuivre mais aussi la participation des groupements acétyles dans ces réactions.

4- Le déplacement des bandes d'amide II vers 1563 cm^{-1} est expliqué par la réticulation des chaînes du chitosane par le cuivre qui peut jouer le rôle d'un agent de réticulation à travers des liaisons de coordination intermoléculaires au sein du chitosane. [66]

5- La disparition de la bande δ_{NH} à 1626 cm^{-1} et son remplacement par un épaulement dans les spectres des complexes 2 et 3 indique probablement plus de cristallinité dans ces deux complexes chose indiquée aussi par le retour de la bande de δ_{NH_2} vers 611 cm^{-1} . [47,141]

6- La disparition de la bande δ_{OH} associée aux liaisons d'hydrogène située à 3113 cm^{-1} dans le spectre du chitosane nettoyé indique de faibles interactions de type liaison d'hydrogène inter et intramoléculaire. [47,66]

7- Dans le spectre du complexe 2 la bande amide III apparaît sous forme d'un épaulement et se déplace vers les plus hautes fréquences dans celui du complexe 3. C'est un autre changement qui indique la modification de l'environnement de la liaison C-N.

8- Le déplacement de la bande ν_{COC} vers les plus grandes fréquences traduit l'interaction entre le chitosane et le cuivre.

4.2.1.4. Interprétation du spectre du quatrième groupe (le complexe 4):

Le spectre IRTF du complexe 4 est différent, dans certains points, de ceux des autres complexes. Il présente, par contre, quelques points en commun avec celui du chitosane. (Figure 4.19)

Les principales caractéristiques de ce spectre sont :

1- Le dévoilement de la bande NH causé par l'interaction du chitosane avec le cuivre [73] est plus prononcé dans le spectre du complexe 4 que les complexes 2 et 3, probablement dû à une interaction chitosane-cuivre différente dans le cas de ce complexe.

2- Contrairement aux autres spectres IRTF, dans le spectres du complexe 4 il n'y a aucun déplacement des bandes ν_{CO} de C3, ν_{CO} de C6, ν_{COC} , δ_{CH_2} , δ_{CH_3} , δ_{OH} liaison hydrogène.

Cette information très importante prouve que ni les groupements OH primaire ni les groupement OH secondaire n'ont contribué à la formation du complexe et le bridge C-O-C n'est pas du tout affecté par la complexation du cuivre.

Cela nous conduit à admettre que pour ce complexe l'ion de cuivre est lié au chitosane uniquement à travers le groupement amine. Le reste des sites de la sphère de coordination du cuivre sont occupés par les molécules d'eau, suivant le modèle du complexe pendant.

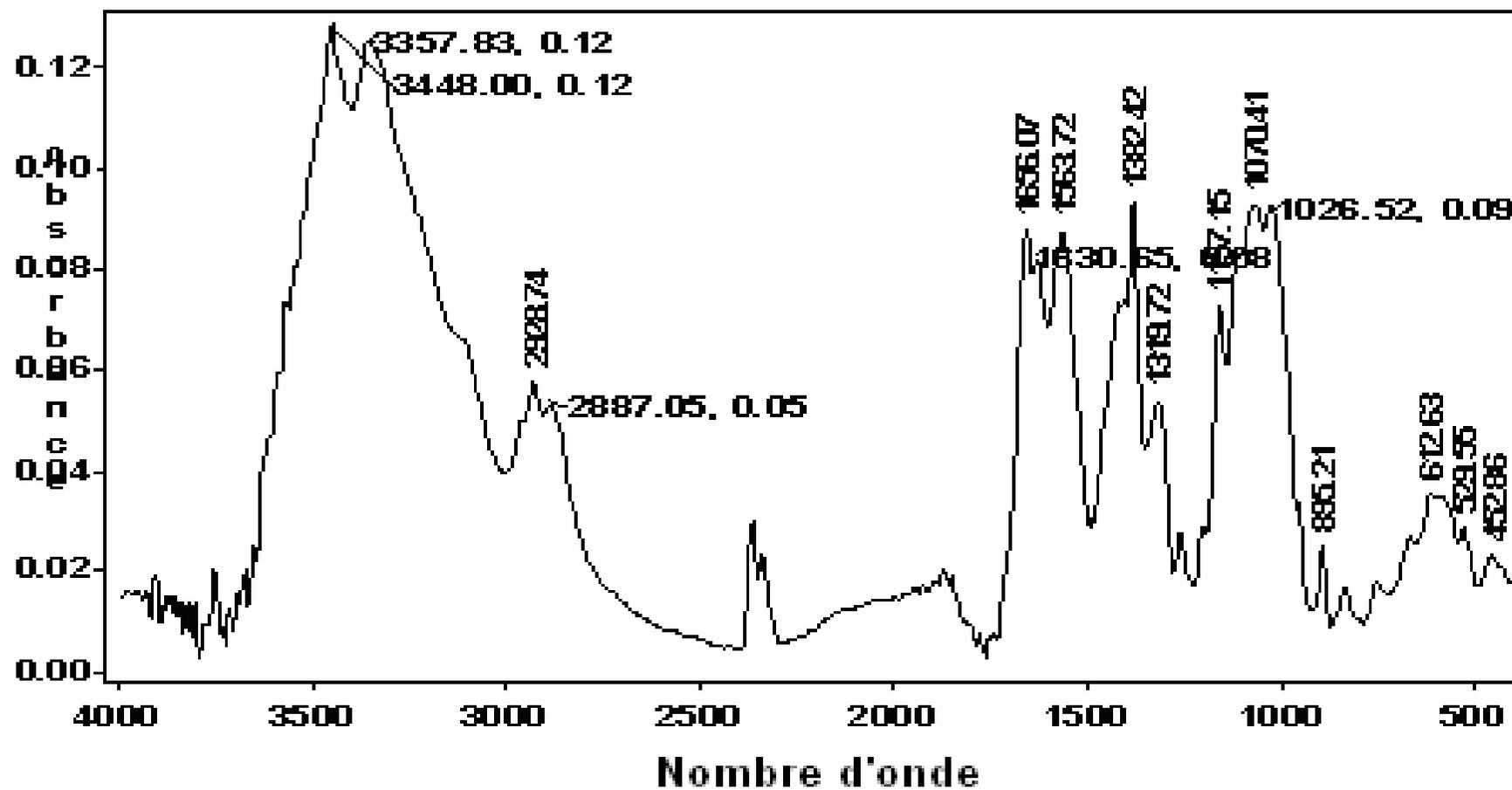


Figure 4.19: Le spectre IRTF du complexe 4 (1 : 4)

4.2.2. Identification des complexes par analyse élémentaire :

Les résultats de l'analyse élémentaire des complexes chitosane-cuivre et leur comparaison avec les pourcentages théoriques sont représentés dans le tableau 4.4.

Tableau 4.4 : Pourcentages expérimentaux et calculés (entre parenthèse) de carbone, hydrogène, et d'azote dans les complexes chitosane-cuivre synthétisés.

	C%	H%	N%
chitosane	38.79 (44.76)	5.331 (6.89)	5.720 (8.7)
Le complexe 1 (C ₆ H ₁₁ NO ₄)Cu _{0.4} (OAc) ₂	28.12 (23.67)	4.138 (3.64)	4.487 (4.602)
Le complexe 2 (C ₆ H ₁₁ NO ₄) ₃ Cu(OAc) ₂	29.09 (32.53)	4.27 (5.00)	3.028 (6.32)
Le complexe 3 (C ₆ H ₁₁ NO ₄) ₄ Cu(OAc) ₂	30.45 (34.91)	4.482 (5.37)	3.44 (6.79)
Le complexe 4 (C ₆ H ₁₁ NO ₄) ₆ Cu(OAc) ₂	34.25 (37.68)	5.019 (5.80)	4.57 (7.32)
Le complexe 5 (C ₆ H ₁₁ NO ₄)Cu _{0.8} (OAc) ₂	16.90 (21.85)	2.463 (3.36)	4.260 (4.25)
Le complexe 6 (C ₆ H ₁₁ NO ₄)Cu _{0.9} (OAc) ₂	15.04 (21.43)	2.27 (3.30)	4.227 (4.17)
Le complexe 7 (C ₆ H ₁₁ NO ₄)Cu (OAc) ₂	11.74 (21.04)	1.868 (3.24)	4.132 (4.09)

Les pourcentages théoriques du carbone, d'hydrogène et de l'azote sont calculés sur la base d'une unité glucosamine du chitosane de formule (C₆H₁₁NO₄) de 161 g/mole en ignorant son hydratation ainsi que l'hydratation de la totalité du complexe. C'est la raison principale de la différence enregistrée entre les résultats théoriques et expérimentaux.

Les masses molaires des complexes calculées à partir des formules brutes déterminé par la spectrophotométrie d'adsorption atomique (SAA) ont conduit à des pourcentages de carbone, d'hydrogène et d'azote assez comparables à ceux déterminés par l'analyse élémentaire.

Cela nous conduit à admettre la méthode de calcul utilisée dans la détermination de la stoichiométrie des complexes par les résultats de la SAA.

En comparant les résultats de l'analyse élémentaire du chitosane avec ceux de ses complexes, on remarque :

- La spécificité qui relie les complexes 5, 6, et 7 par rapport aux autres complexes. La large différence observée entre les pourcentages de carbone, d'hydrogène, et d'azote dans le chitosane et ces trois complexes indique la formation véritable des complexes.
- Contrairement aux autres complexes, il y a une faible différence entre les pourcentages enregistrés pour le chitosane et le complexe 4 sauf pour l'azote, indiquant la préservation de la même structure de la chaîne polymérique même après complexation lors de l'interaction cuivre-groupe amine dans le complexe 4.

4.2.3. Identification des complexes par UV-VIS:

Le chitosane a été utilisé comme ligne de base pour n'avoir que les pics d'absorption dus à la présence du cuivre au sein du chitosane.

Les spectres UV-VIS enregistrés pour tous les complexes montrent le même pic d'absorption située à 215,1nm avec un épaulement. (Tableau 4.5).

Ce pic d'absorption est situé dans le proche UV (200 à 380 nm), il peut être attribué aux bandes intraligands du chitosane qui existe dans le spectre électronique du chitosane à 205nm.

Ce sont des transitions de type $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$ [144]. Ce pic est déplacé vers 215 nm dans les spectres électronique des complexes chitosane-cuivre à

cause de la présence du métal. L'épaule observé à la sortie de ce pic est causé par la destruction de la symétrie du ligand.

Le spectre électronique du complexe 4 est le seul qui a présenté deux pics d'absorption, tous les deux sont des pics intraligands. Le premier est identique à celui du chitosane et l'autre, correspond à la longueur d'onde d'adsorption maximale (λ_{MAX}), est identique à celui des autres complexes. Cela reflète la forte ressemblance entre la structure du chitosane et le complexe 4 et sa spécificité par rapport aux autres complexes.

Tableau 4.5 : Les pics d'absorption UV-VIS des complexes chitosane-cuivre préparés

complexe	λ (nm)	absorption
1 (1 : 1)	215,1	0,982
2 (1 : 2)	215,1	0,336
3 (1 : 3)	215,1	0,785
4 (1 : 4)	205	0.873
	215,1	0,960
5 (2 : 1)	215,1	0,728
6 (3 : 1)	215,1	0,902
7 (4 : 1)	215,1	0,510

4.2.4. Identification des complexes par DRX :

Les diffractogrammes des complexes 6 et 7 (figures. 4.22 et 4.23) montrent plus de pics que celui du chitosane mais qui sont moins large, ce qui révèle la formation d'une nouvelle phase cristalline. [23]

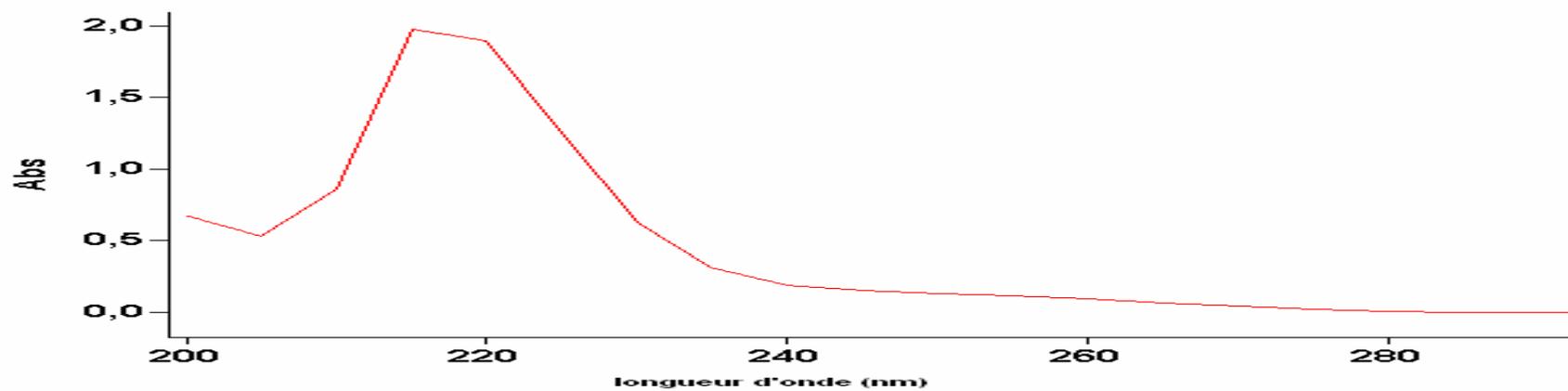


Figure 4.20 : Le spectre UV des complexes 5, 6, et 7

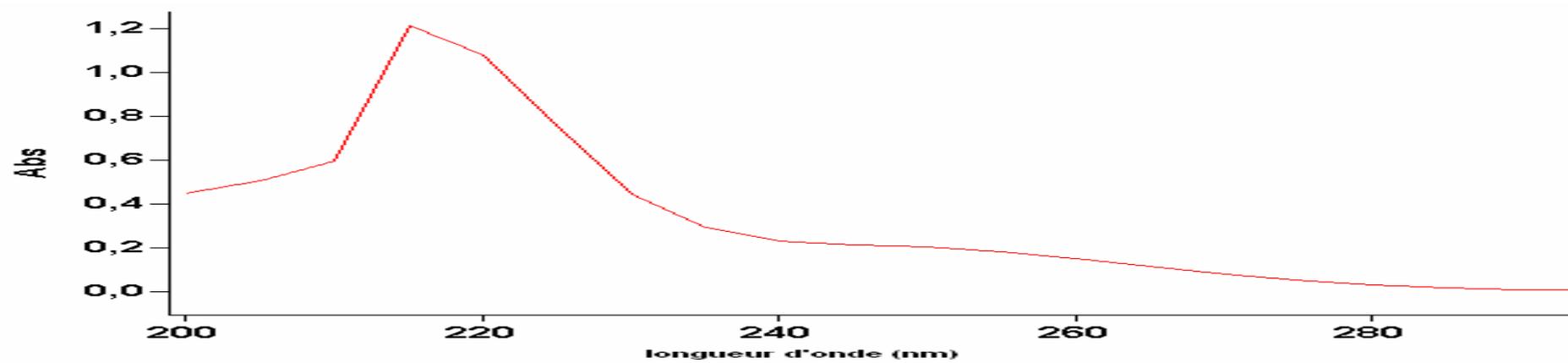


Figure 4.21 : Le spectre UV des complexes 1, 2, et 3

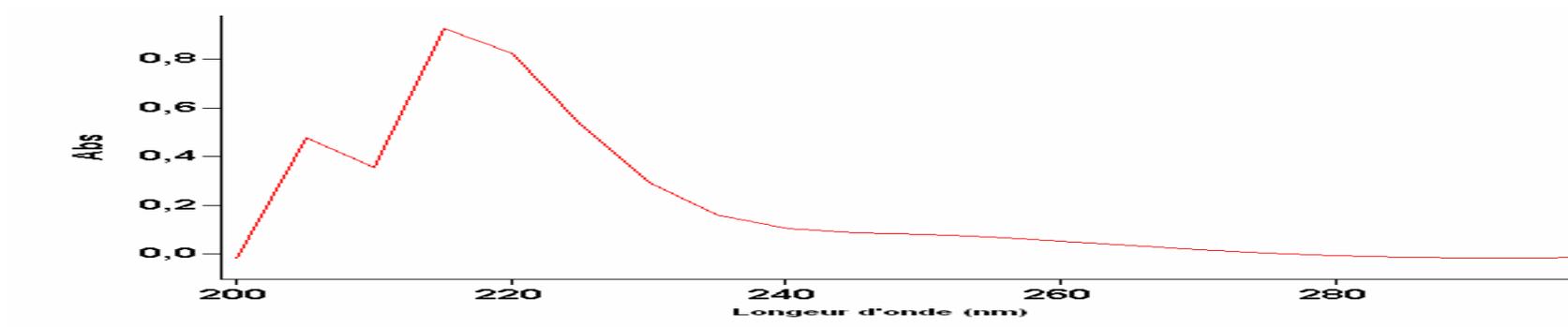


Figure 4.22: Le spectre UV du complexe 4

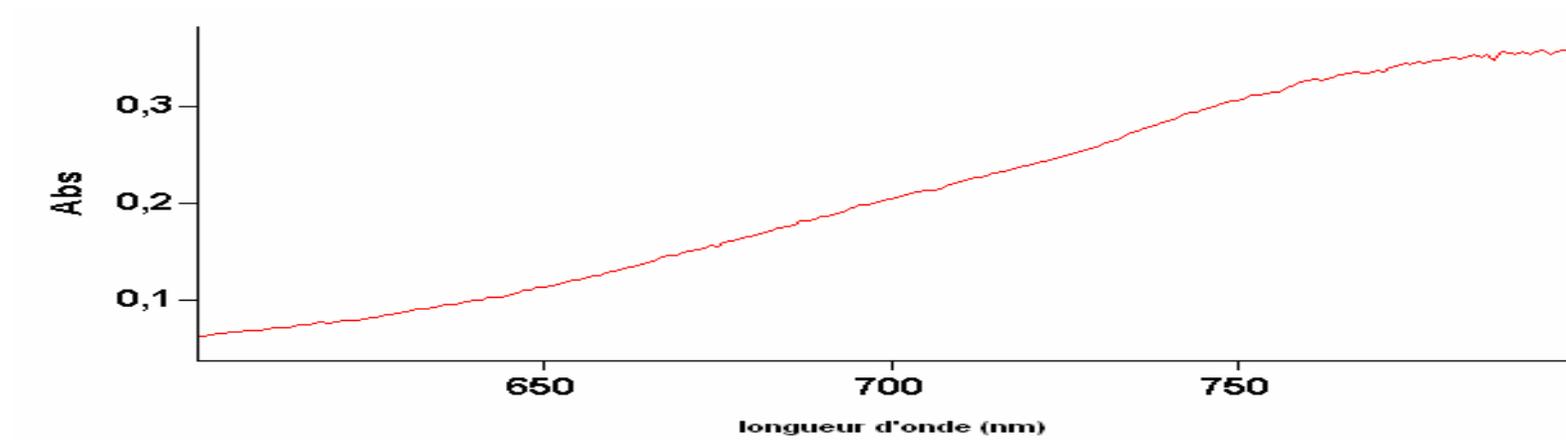


Figure 4.23: La bande d-d du complexe1

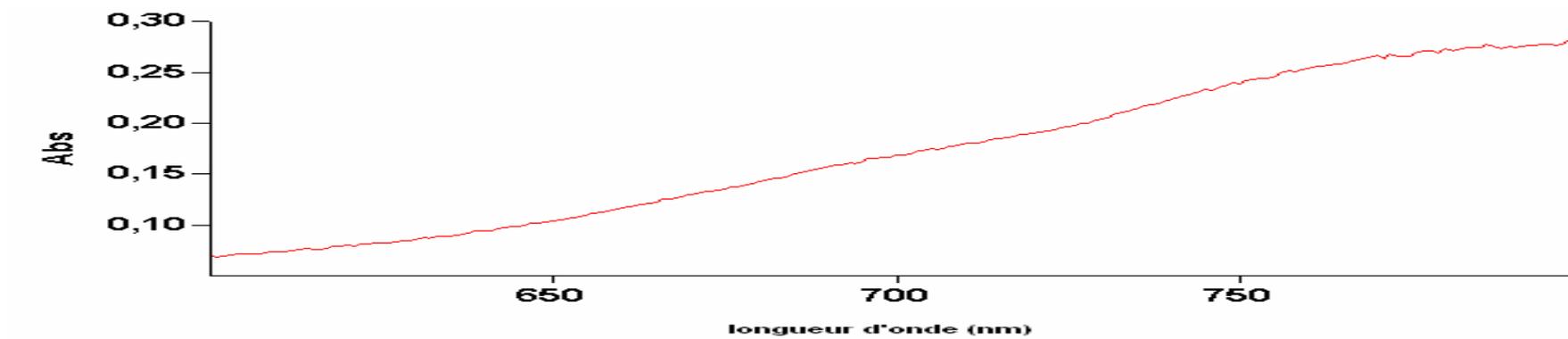


Figure 4.24: La bande d-d du complexe2

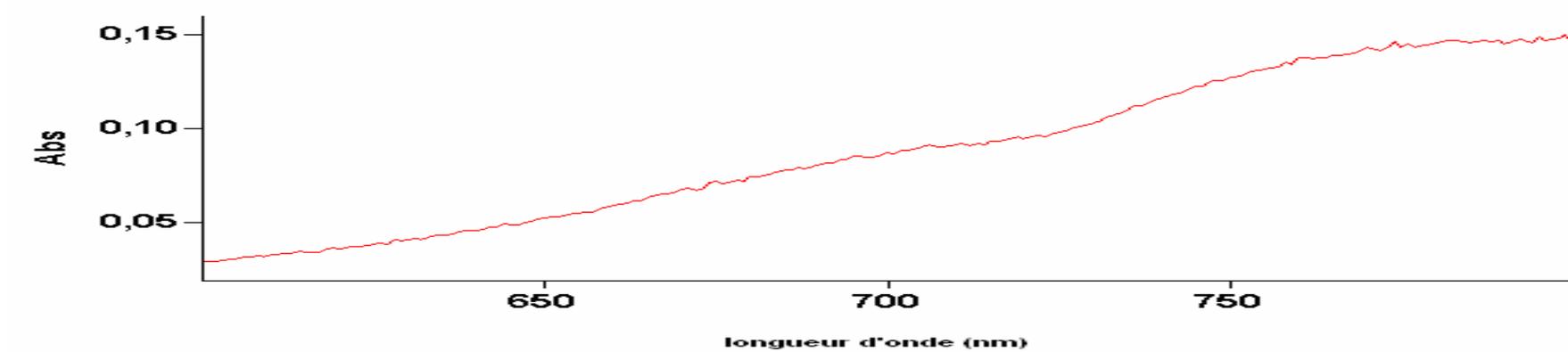


Figure 4.25 : La bande d-d du complexe3

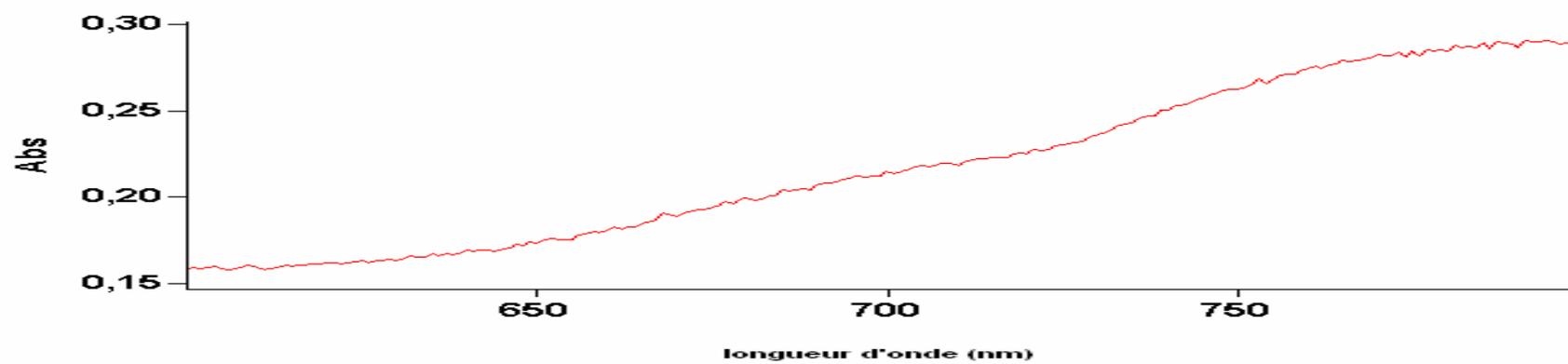


Figure 4.26 : La bande d-d du complexe4

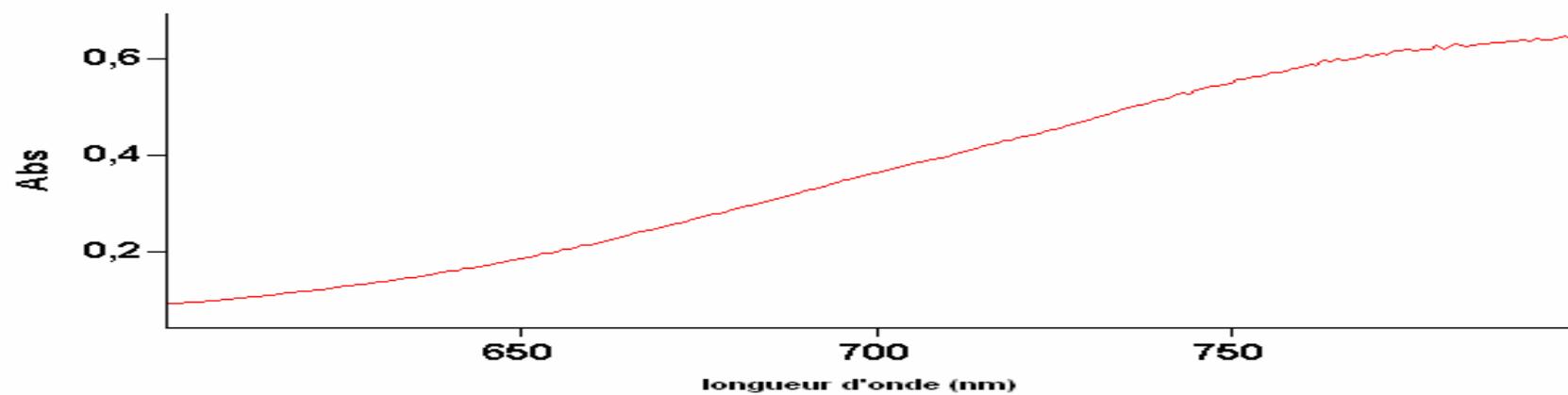


Figure 4.27 : La bande d-d du complexe5

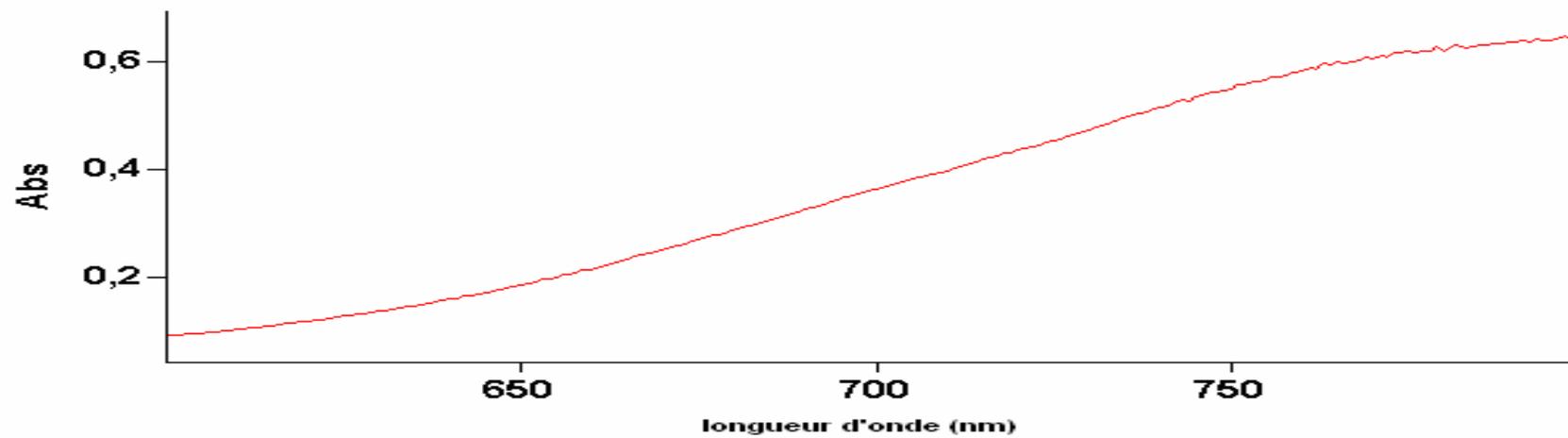


Figure 4.28 : La bande d-d du complexe6

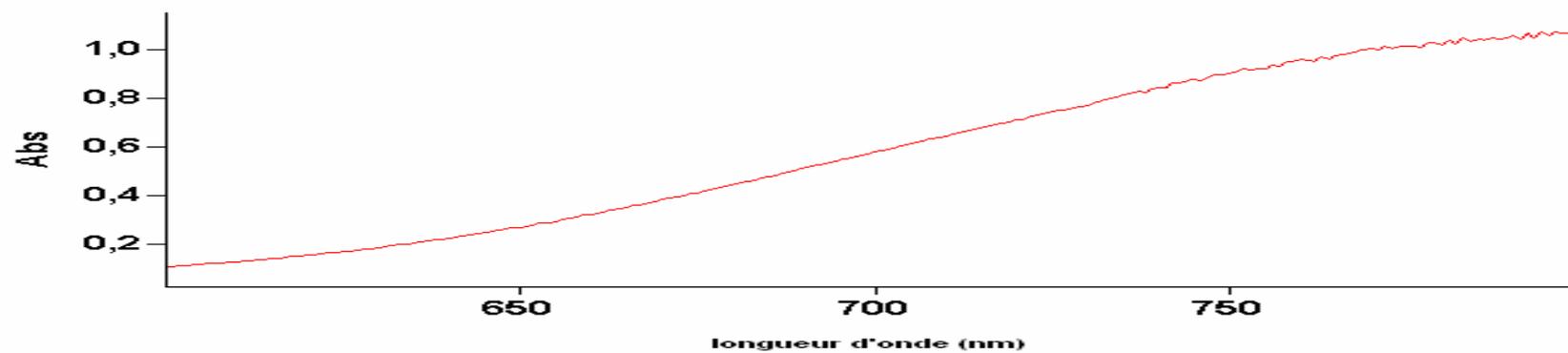


Figure 4.29 : La bande d-d du complexe7

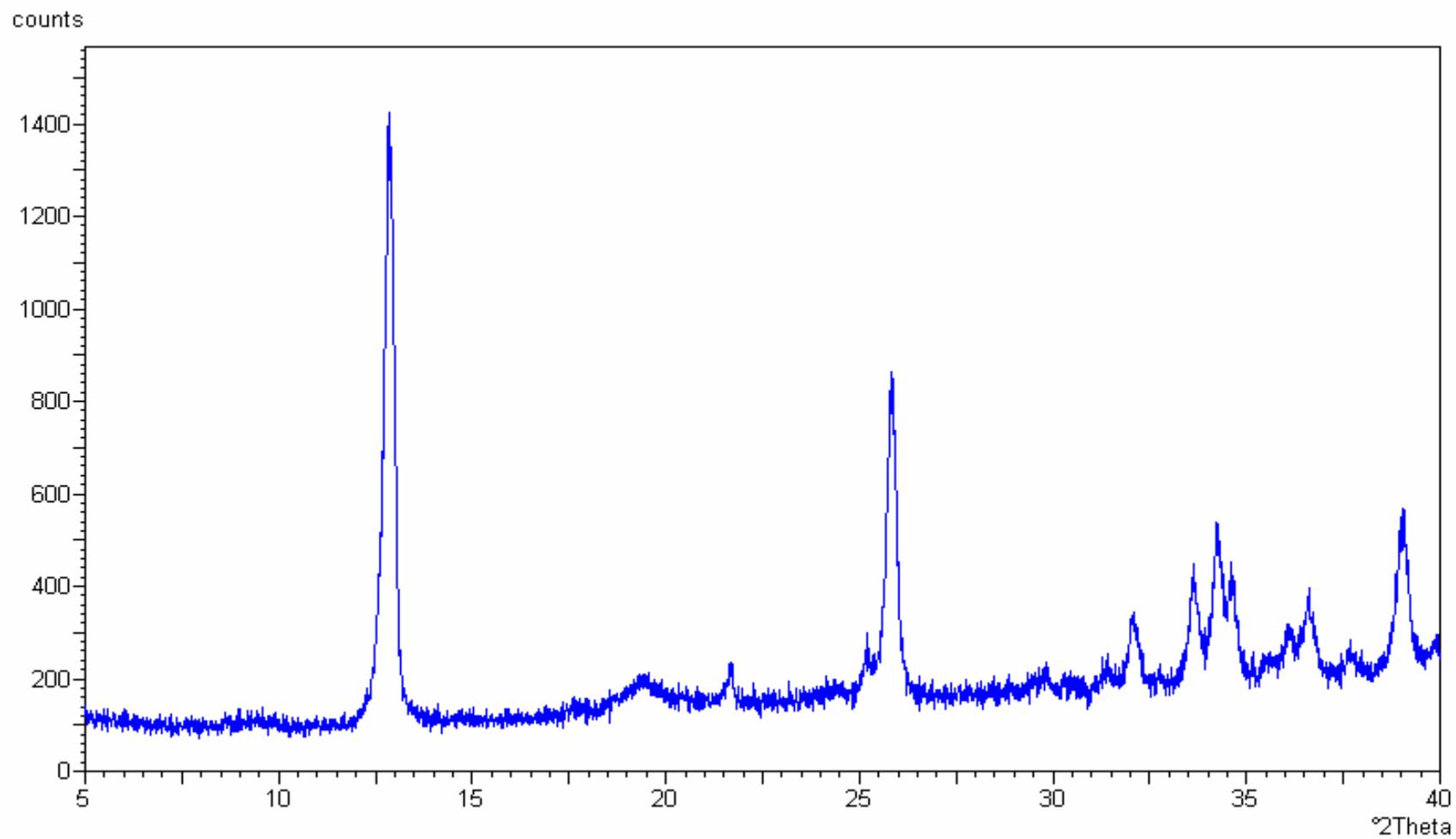


Figure 4.30 : Le diffractogramme du complexe 6

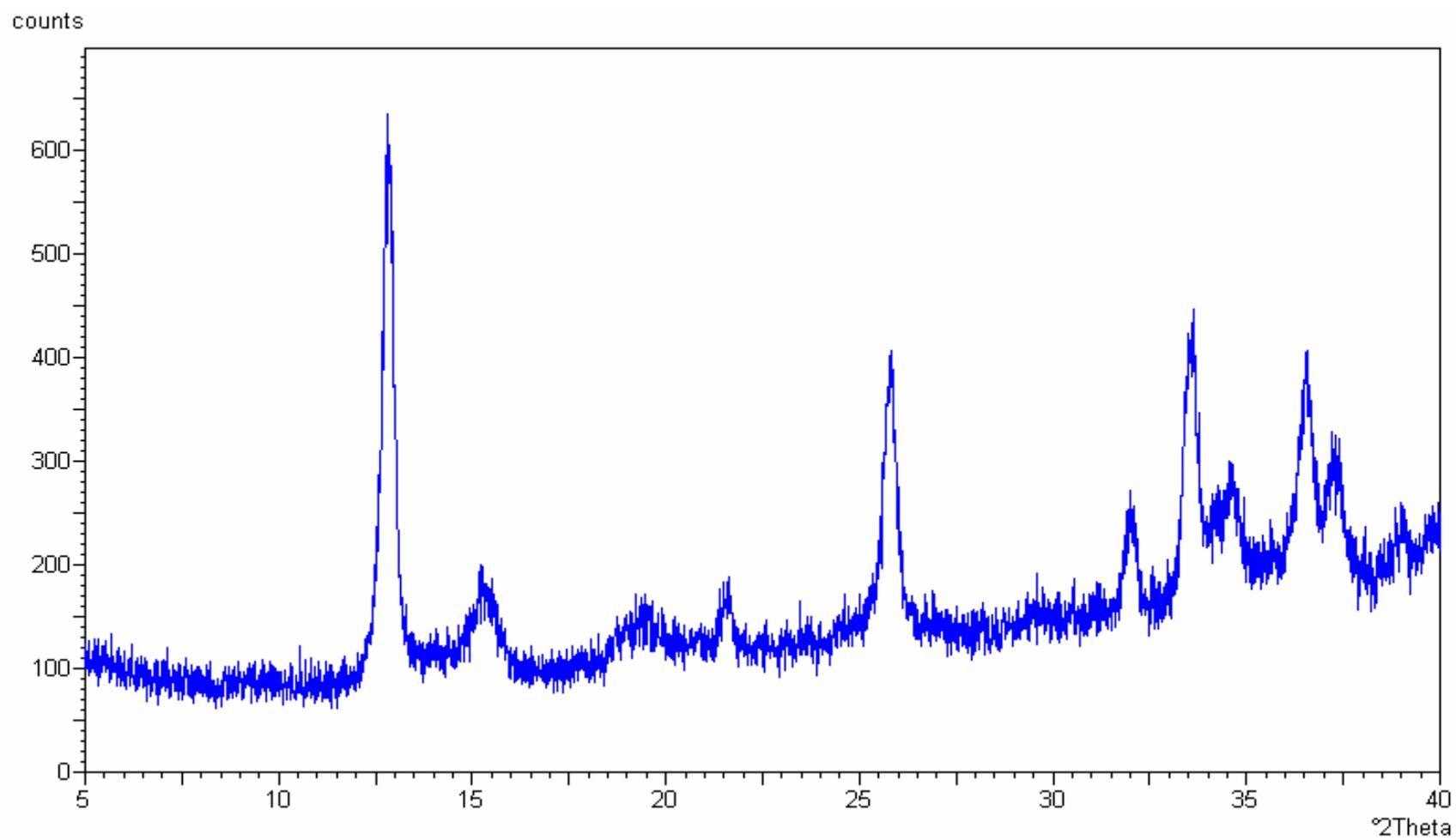


Figure 4.31 : Le diffractogramme du complexe 7

4.2.5. Identification des complexes par SAA :

L'analyse par SAA nous permet d'avoir le pourcentage de cuivre dans chaque complexe et le vrai rapport stoichiométrique (cuivre : unité glucosamine) dans lequel ils se sont formés [19]. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.6

Tableau 4.6 : Les résultats obtenus de la spectrométrie d'absorption atomique

Numéro de complexe	Rapport Stoichio-métrique proposé	Masse du complexe (g)	Concentration de cuivre (ppm)	Pourcentage de cuivre ¹ (%)	Le vrai rapport Stoichio-métrique
1	1 : 1	0,013	1,97	15,15	0,4 : 1
2	1 : 2	0,025	3,16	12,64	1 : 3
3	1 : 3	0,038	3,74	9,84	1 : 4
4	1 : 4	0,05	3,21	6,42	1 : 6
5	2 : 1	0,0063	2,05	32,54	0,8 : 1
6	3 : 1	0,0084	2,96	35,24	0,9 : 1
7	4 : 1	0,0063	2,60	41,27	1 : 1

Le pourcentage de cuivre par unité glucosamine est calculé à partir des résultats de SAA par l'équation suivante :

$$\text{Cu \%} = C_{\text{Cu}} \times 10^{-3} / m \times 100 \quad (\text{eq 4.5})$$

Avec

C_{Cu} est la concentration de cuivre en ppm

m est la masse de complexe utilisé dans l'analyse SAA

Le vrai rapport stoichiométrique est calculé en utilisant l'équation 4.6 pour les complexes 1, 2, 3 et 4 et l'équation 4.7 pour les complexes 5, 6 et 7

$$\text{Rapport stoichiométrique} = 63,55 \times m / 161 \times C_{\text{Cu}} \times 10^{-3} \quad \text{eq 4.6}$$

$$\text{Rapport stoichiométrique} = 161 \times C_{\text{Cu}} \times 10^{-3} / 63,55 \times m \quad \text{eq 4.7}$$

Avec

63,55 est la masse molaire du cuivre

161 est la masse de l'unité glucosamine ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}$)

C_{Cu} est la concentration de cuivre en ppm

m est la masse de complexe utilisé dans l'analyse SAA

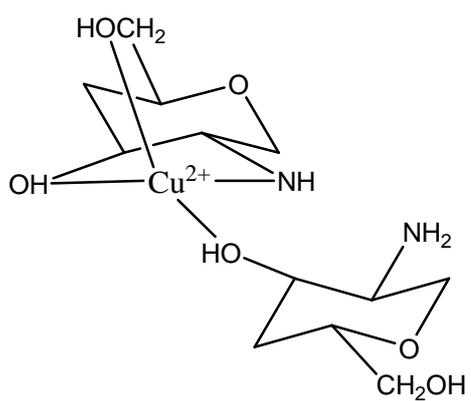
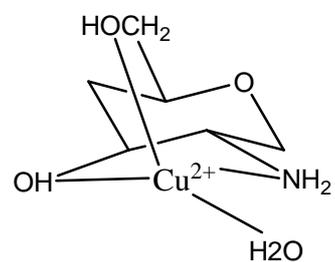
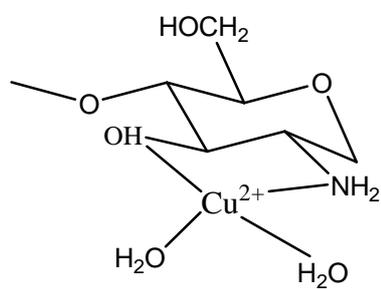
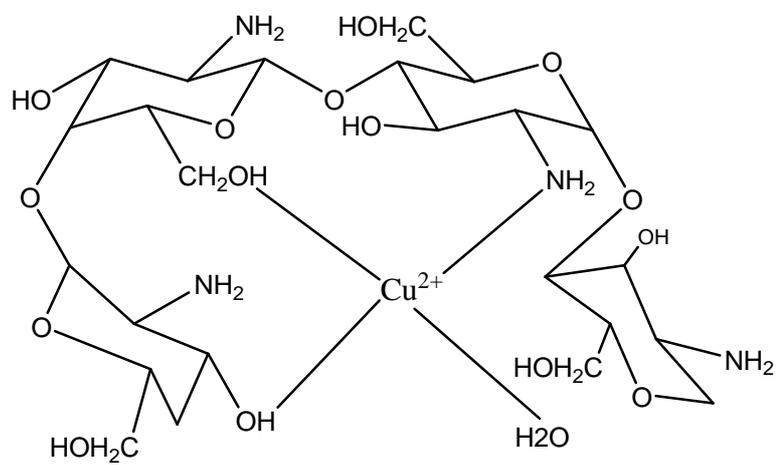
4.2.6. La structure la plus probable des complexes synthétisés :

X. Yin et al [12] ont démontré, à partir du spectre RPE d'un complexe cuivre-chitosane (1 : 8), que le cuivre forme un complexe avec le chitosane dans une géométrie plan carré.

On a réussi à synthétiser le complexe 1 : 1 (résultat confirmé par SAA) dans lequel la sphère de coordination du cuivre à pH autour de 6.1 est $[\text{Cu NH}_2(\text{OH})_2]$ avec un quatrième site de coordination occupé par une molécule d'eau ou un atome d'oxygène du C3 d'une autre unité glucosamine[100].

Suivant les données fournies par la littérature et par nos résultats, six structures de nos complexes ont été proposées. Cette proposition est basée surtout sur le vrai rapport stoichiométrique suivant lequel le complexe s'est formé, sur l'examen des spectres IRTF des complexes pour savoir si les sites amines, OH du C3, et OH du C6 ont réellement interagi avec le cuivre ou pas, et finalement sur les spécificités du spectre électronique et l'analyse élémentaire de tous les complexes et particulièrement le complexe 4.

Ces résultats nous conduisent à la proposition suivante (figure 4.24) des structures des complexes synthétisés qui sont proches de ceux proposés par X. Wang et al [23]

**a₁****a₂****b****c**

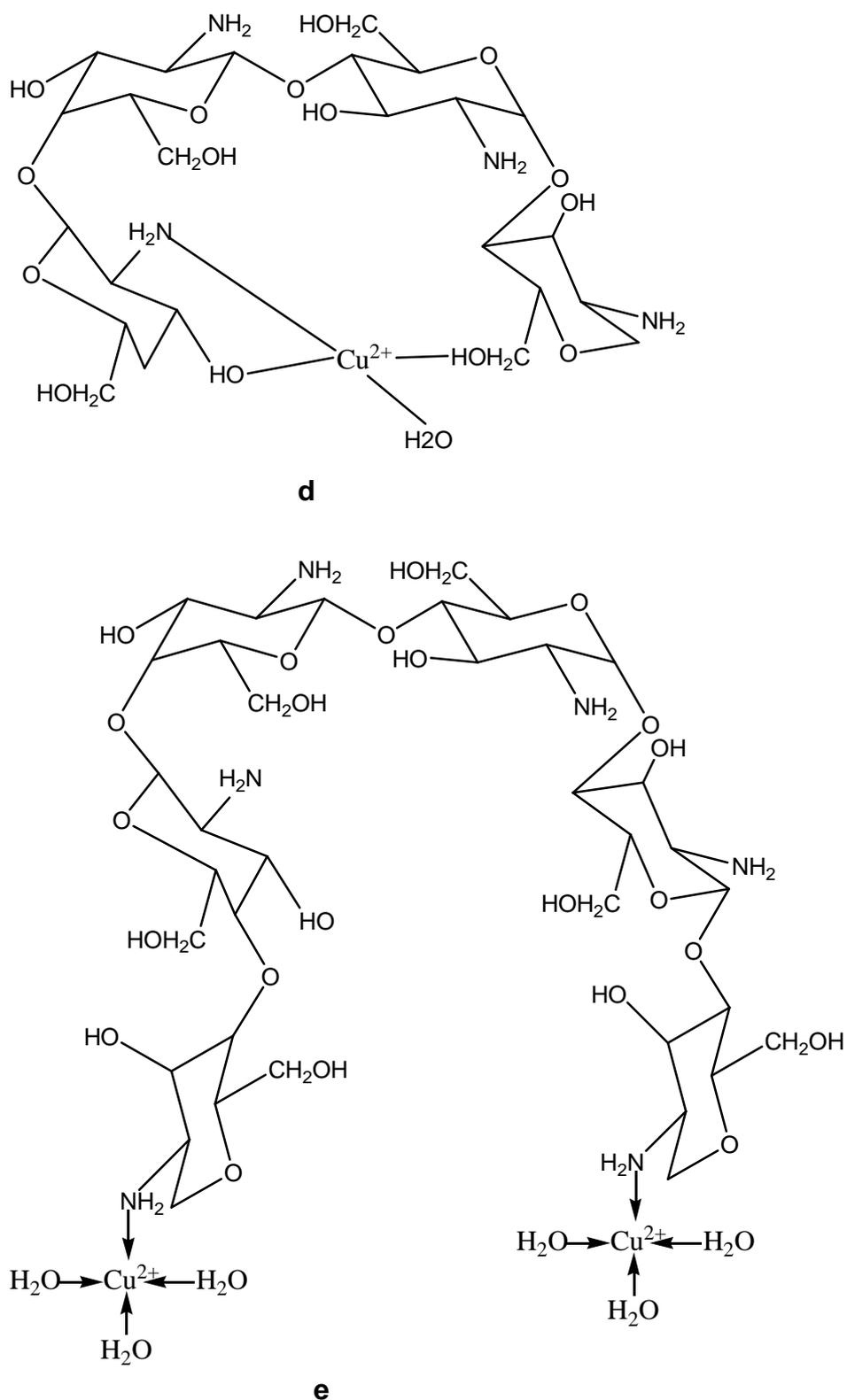


Figure 4.32 : Les structures proposées des complexes : a_1 et a_2 : les complexes 5, 6 et 7, **b** : le complexe 1, **c** : le complexe 2, **d** : le complexe 3, et **e** : le complexe 4

4.3. Test de l'activité antibactérienne contre la salmonelle :

4.3.1. Détermination du taux d'inhibition :

Les résultats de la mesure des absorbances des solutions de chitosane et des sept complexes ainsi que les taux d'inhibition sont présentés dans les tableaux 4.7 et 4.8, respectivement.

L'effet de la présence et la quantité de cuivre au sein du chitosane sur son taux d'inhibition est traduit par l'augmentation du pouvoir inhibiteur des produits.

4.3.2. Détermination de la CMI :

Les résultats de la détermination de la CMI sont présentés dans la table 4.9 Les valeurs de la CMI pour les complexes chitosane-cuivre sont de 2 à 7 fois moins que celle du chitosane

4.3.3. Détermination de la CMB :

Les résultats de la détermination de la CMB sont présentés dans le tableau 4.11

Tableau 4.7: Les absorbances des solutions (produit + bactérie avant et après incubation)

Absorbance	solvant	chitosane	complexe1	complexe2	complexe3	complexe4	complexe5	complexe6	complexe7
A ₁	0.058	0.063	0.220	0.216	0.190	0.166	0.673	0.789	1.327
A ₂	0.06	0.058	0.229	0.189	0.187	0.166	0.690	0.769	1.304
A ₃	0.05	0.059	0.232	0.195	0.199	0.160	0.689	0.770	1.299
A _{moy}	0.056 ± 0.01	0.06 ± 0.003	0.227 ± 0.007	0.200 ± 0.02	0.192 ± 0.01	0.164 ± 0.03	0.684 ± 0.008	0.776 ± 0.06	1.31 ± 0.014
A ₀₁	0.049	0.046	0.217	0.108	0.190	0.153	0.655	0.79	1.289
A ₀₂	0.051	0.054	0.221	0.2	0.192	0.157	0.677	0.779	1.301
A ₀₃	0.038	0.059	0.237	0.193	0.185	0.164	0.681	0.780	1.301
A _{0moy}	0.046 ± 0.006	0.053 ± 0.006	0.225 ± 0.01	0.197 ± 0.046	0.189 ± 0.003	0.158 ± 0.003	0.671 ± 0.01	0.783 ± 0.005	1.297 ± 0.006

Tableau 4.8 : Le taux d'inhibition du chitosane et des complexes chitosane-cuivre

	chitosane	complexe1	complexe2	complexe3	complexe4	complexe5	complexe6	complexe7
taux d'inhibition (%)	46	85	77	77	54	100	100	100

Tableau 4.9 : Les valeurs de la CMI en mg/ml

essai	Le solvant	chitosane	complexe1 (1 : 1)	complexe2 (1 : 2)	complexe3 (1 : 3)	complexe4 (1 : 4)	complexe5 (2 : 1)	complexe6 (3 : 1)	complexe7 (4 : 1)
premier essai	0.1	0.25	0.0156	0.0625	0.0625	0.125	0.0039	0.0039	0.0039
deuxième essai	0.1	0.25	0.0156	0.0312	0.0625	0.125	0.0039	0.0039	0.0039
troisième essai	0.1	0.5	0.0312	0.0312	0.0312	0.125	0.00781	0.00195	0.00195
moyenne	0.1 ± 0.00	0.33 ± 0.125	0.0208 ± 0.0097	0.0416 ± 0.016	0.052 ± 0.02	0.125 ± 0.00	0.0052 ± 0.0019	0.00325 ± 0.001	0.00325 ± 0.001

Tableau 4.10 : Classement des produits par perfection de leur activité antibactérienne

Le produit	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Emplacement de CMI	Activité antibactérienne
Le chitosane	330	$100 < \text{CMI} < 500$	moyenne
Le complexe 1	20.8	$\text{CMI} < 100$	bonne
Le complexe 2	41.6	$\text{CMI} < 100$	bonne
Le complexe 3	52	$\text{CMI} < 100$	bonne
Le complexe 4	125	$100 < \text{CMI} < 500$	moyenne
Le complexe 5	5.2	$\text{CMI} < 100$	bonne
Le complexe 6	3.25	$\text{CMI} < 100$	bonne
Le complexe 7	3.25	$\text{CMI} < 100$	bonne

Tableau 4.11 : Les valeurs de la CMB en mg/ml

essai	Le solvant	chitosane	complexe1 (1 : 1)	complexe2 (1 : 2)	complexe3 (1 : 3)	complexe4 (1 : 4)	complexe5 (2 : 1)	complexe6 (3 : 1)	complexe7 (4 : 1)
premier essai	0.1	0.5	0.0312	0.0625	0.125	0.25	0.0156	0.00781	0.00781
deuxième essai	0.1	0.5	0.0312	0.0625	0.0625	0.5	0.0156	0.00781	0.00781
troisième essai	0.1	0.5	0.0312	0.0625	0.0625	0.25	0.00781	0.00781	0.00781
moyenne	0.1 ± 0.00	0.5 ± 0.00	0.0312 ± 0.00	0.0625 ± 0.00	0.083 ± 0.01	0.333 ± 0.125	0.013 ± 0.0039	0.00781 ± 0.00	0.00781 ± 0.00

4.3.4. Interprétation des résultats :

Les mécanismes possibles de l'activité antibactérienne de nos produits sont :

1- le chitosane, sur la surface cellulaire des bactéries, peut former une membrane qui empêche la pénétration des éléments nutritifs à l'intérieur de la cellule bactérienne.

2- le chitosane de faible poids moléculaire entre à l'intérieur des cellules. Puisque le chitosane peut adsorber et flocculer les substances électronégatives dans la cellule, il détruit l'activité physiologique des bactéries et les tue. [117]

Le chitosane que nous avons testé pour son activité antibactérienne semble être incapable de passer à travers la membrane extérieure des bactéries puisque il est de haut poids moléculaire (385 KDa) et puisque aussi que cette membrane bactérienne fonctionne comme une barrière extérieure efficace contre les macromolécules. Par conséquent, l'accès direct à la partie intercellulaire de la bactérie par ce chitosane est improbable.

L'activité antibactérienne de notre chitosane est supposée être suivant le premier mécanisme suivant lequel la charge positive des groupements amines sur C2 a conduit à une structure polycationique qui peut interagir avec les composants anioniques (lipopolysaccharides, protéines) et les groupements d'acide carboxylique chargés négativement présents sur la surface des microorganismes. Ils forment ensemble un complexe polyélectrolytique, celui là peut réagir comme une couche imperméable autour de la cellule et supprime l'activité métabolique des bactéries en bloquant la perméabilité aux éléments nutritifs à travers les parois cellulaires. Ce qui conduit à une altération de la structure des parois cellulaires et donc la perméabilité de la membrane cellulaire. Ces deux effets conduisent à la destruction de la cellule bactérienne. [10,23,36,117]

Le chitosane testé a montré un faible taux d'inhibition contre *Salmonella enteritidis* (46%) fort probablement à cause de son haut poids moléculaire puisque le poids moléculaire est l'un des facteurs principaux qui affectent l'activité

antibactérienne du chitosane [9,10,88,104], sachant que pour les bactéries à gram négatif, avec la diminution du poids moléculaire l'activité antibactérienne augmente. [117]

La valeur de CMI pour notre chitosane est de 0.33 mg/ml. À titre comparatif, CMI pour un chitosane de poids moléculaire de 788 kDa est de 0.5 mg/ml contre la même bactérie. [23]

Cette légère diminution est due probablement à la différence de poids moléculaire entre notre chitosane et celui de la référence.

L'intensification des groupements amines protonés (NH_3^+) sur le chitosane, par chélation du cuivre conduit à l'augmentation de la quantité de chitosane adsorbé sur la surface des bactéries. [23,36] et par conséquence à l'amélioration de l'activité antibactérienne, chose remarquée en examinant les taux d'inhibition et les valeurs de la CMI et la CMB des complexes 1, 2, 3, et 4.

Pour les bactéries à gram négatif, avec la diminution du poids moléculaire l'activité antibactérienne augmente. La raison principale de ce fait peut être que le chitosane de faible poids moléculaire entre dans les cellules microbiennes plus facilement et détruit le métabolisme de la cellule puisque c'est le mécanisme le plus favorable pour ce type de bactérie. [117]

Les complexes 5, 6, et 7 ont cette caractéristique, la dégradation qu'a subit le chitosane grâce à la liaison de coordination avec le cuivre permet à ces trois complexes non seulement l'intensification de la charge positive sur le chitosane mais aussi lui donne la taille favorable pour pouvoir pénétrer à l'intérieur de la cellule bactérienne afin de la détruire suivant le deuxième mécanisme. Ces complexes ont pu atteindre des valeurs de CMI de l'ordre de quelques $\mu\text{g/ml}$ (voir tableau 4.9) avec un taux d'inhibition de 100% (voir tableau 4.8).

Le mécanisme le plus accepté dans ce cas est expliqué par le fait que le chitosane peut altérer la perméabilité de la membrane cellulaire de la bactérie et,

encore, empêcher la reconstruction de la cellule par le rassemblement de ces constituants. Ce qui conduit finalement au décès définitif de la bactérie [10], c'est l'activité bactéricide du chitosane, elle a été testée en déterminant la valeur de la CMB.

Grâce à leur pouvoir pénétrant, les complexes 5, 6, et 7 ont marqué des valeurs de la CMB de l'ordre du $\mu\text{g/ml}$, les complexes 1, 2, 3, et 4, grâce à l'intensification de la charge positive sur leurs chaînes, ont marqué des valeurs de la CMB plus faibles que celle du chitosane qui est de 0.5 mg/ml (voir tableau 4.11).

En conclusion, et selon la méthode proposée par Pessini et al. (2003) et utilisée par F. CHAIB KOURI [145] l'évaluation de l'activité antibactérienne se fait comme suit:

- pour une CMI < 100 $\mu\text{g/ml}$, l'activité antibactérienne est bonne
- pour 100 < CMI < 500 $\mu\text{g/ml}$, l'activité antibactérienne est moyenne
- pour une 500 < CMI < 1000 $\mu\text{g/ml}$, l'activité antibactérienne est faible
- pour une CMI > 1000 $\mu\text{g/ml}$, l'activité antibactérienne est nulle

Le classement de nos produits par perfection de leur activité antibactérienne est montré dans le tableau 4.10

Les différences observées entre les valeurs de la CMI et la CMB des produits de même taux d'inhibition (les complexes 5,6, et 7) sont probablement due aux différents pourcentages de cuivre dans ces complexes. Ces différences sont clairement dévoilées dans les résultats du test statistique de NEWMAN-KEULS qui classe les complexes dans des groupements homogènes (tableau 4.17)

A titre informatif, nous reportons ci après (tableau 4.12) les résultats de A. V. Yadav et S. B. Bhise [146] qui ont étudié l'activité antibactérienne du chitosane caractérisé par une viscosité de 325, déterminé dans 2 M d'acide acétique pour une concentration de 1%, et d'un degré de désacétylation de 80%. Ils ont étudié son activité contre les organismes de la typhoïde (*S. enterica*, *S. enterica* var. *Paratyphi-A* et *S. enterica* var. *Paratyphi-B*) et l'ont comparé avec

celles des antibiotiques standard (Ciprofloxacine et Sparfloxacine). Ils ont trouvé que la valeur de la CMI du chitosane est de 50µl. La méthode utilisée par les auteurs est la détermination du diamètre de la zone d'inhibition autour d'un disque en papier filtre imbibé dans des solutions de chitosane de différentes concentrations.

Tableau 4.12 : Comparaison entre l'activité antibactérienne du chitosane avec les antibiotiques standards contre *S. enterica*, *S. enterica* var. *Paratyphi-A* et *S. enterica* var. *Paratyphi-B* [146]

Organisme testé	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)			
	Ciprofloxacine (25 µg)	Sparfloxacine (25 µg)	Chitosane (50 µg)	Chitosane (100 µg)
<i>S. enterica</i>	43	26	20	39
<i>S. enterica</i> var. <i>Paratyphi-A</i>	43	21	18	38
<i>S. enterica</i> var. <i>Paratyphi-B</i>	45	24	16	35

4.3.5. Analyse statistique des résultats :

Dans de nombreuses branches de la biologie, les calculs statistiques sont nécessaires pour extraire quelque chose de sensé de certaines données. [148]

Lorsque nous analysons des données, notre objectif est simple : nous souhaitons tirer les conclusions les plus solides possibles à partir d'un nombre limité de données.

Pour réaliser cela, nous devons surmonter un problème majeur :

Des différences importantes sont souvent masquées par la variabilité biologique et / ou l'imprécision expérimentale, ce qui rend difficile de distinguer les différences réelles de la variation aléatoire.

La rigueur statistique permet d'éviter de commettre ce genre d'erreur, ce sont les principales raisons pour lesquelles nous avons besoin d'effectuer des calculs statistiques. [131]

Le tableau 4.13 représente les résultats du calcul statistique : la probabilité et le classement des produits en groupes homogènes.

Ces résultats indiquent une différence très hautement significative ($p < 0.001$) entre les produits testés pour la détermination des taux d'inhibition et des valeurs de la CMI. Une différence hautement significative (0.003) est enregistrée pour les résultats de la détermination des valeurs de la CMB.

Le classement statistique des complexes testés en groupes homogènes est en accord avec l'interprétation de nos résultats concernant la faible différence entre le chitosane et le complexe 4. Ce qui est en accord avec le classement des produits selon leur valeur de la CMI (tableau 4.9)

La particularité qui relie les complexes 5, 6, et 7 par rapport aux autres complexes est visible dans les résultats du taux d'inhibition. Pour ces complexes malgré le taux d'inhibition de 100% enregistré pour chacun d'eux, ils ne sont pas classés dans le même groupe homogène. Cela dévoile la différence entre ces produits provoquée par les différents taux de cuivre présent dans ces complexes et qui a causé les différences dans les valeurs de la CMI et la CMB enregistrés pour ces produits.

Tableau 4.13 : Les résultats du calcul statistique

	Le taux d'inhibition		La CMI		La CMB	
	Le groupe homogène	La probabilité	Le groupe homogène	La probabilité	Le groupe homogène	La probabilité
Le solvant	E	0.0000	/	0.0000	/	0.003
Le chitosane	E		A		A	
Le complexe 1	D		C		C	
Le complexe 2	D		C		C	
Le complexe 3	D		C		C	
Le complexe 4	E		B		B	
Le complexe 5	C		C		C	
Le complexe 6	B		C		C	
Le complexe 7	A		C		C	

CONCLUSION

Les principaux résultats qu'on peut tirer de ce travail sont les suivants :

L'utilisation du chitosane à l'état dissous (pH 6.2) pour la formation des complexes a mené à avoir moins de liaisons hydrogène et moins de cristallinité et donc une meilleure accessibilité aux sites de chélation internes (groupements amines).

Pour les complexes chitosane-cuivre formés, les analyses par SAA ont montré que la quantité de cuivre mise en solution n'a pas réagi complètement avec le chitosane. Ce qui a conduit à la formation de complexes avec des rapports molaires différents de ceux proposés au départ.

Les conditions opératoires dans lesquels les complexes se sont formés sont douces (température ambiante) donc elles ne peuvent pas conduire à la dépolymérisation du chitosane. La dégradation du produit observée dans les complexes 5,6 et 7 est dû uniquement à la liaison de coordination (liaison forte) établis entre les groupements amines et hydroxyles de l'unité glucosamine et les ions de cuivre (II) qui a affaibli les liaisons du bridge.

L'introduction du cuivre au sein du chitosane par chélation a conduit à l'amélioration de son activité antibactérienne contre la salmonelle enteritidis.

Le chitosane semble être incapable de passer à travers la membrane extérieure des bactéries puisque cette membrane fonctionne comme une barrière extérieure efficace contre les macromolécules. Le mécanisme avec le quel il a pu avoir un taux d'inhibition de 46% est probablement sa réaction, grâce à la charge positive des groupements amines, comme une couche imperméable autour de la

cellule bactérienne ce qui conduit à une altération de la structure des parois cellulaires et donc à la destruction de la cellule bactérienne.

En plus de son activité antibactérienne, l'introduction du cuivre au sein du chitosane conduit au renforcement de la charge positive des groupements amines. Ces deux facteurs conduisent à l'amélioration de l'effet antibactérien des complexes 1, 2, 3, et 4 suivant le même mécanisme que celui du chitosane.

Dans le cas des complexes 5, 6, et 7, en plus de l'intensification de la charge positive sur les sites amines, la dépolymérisation du chitosane, sous l'effet des liaisons de coordination, permet à ces complexes l'accès direct et facile à la partie intercellulaire de la bactérie et détruire ainsi le métabolisme de la cellule. Ces complexes ont marqué les meilleurs résultats avec un taux d'inhibition de 100% et des valeurs de la CMI et la CMB de l'ordre du $\mu\text{g/ml}$.

Dans notre travail, l'effet de la liaison de coordination et la corrélation structure - activité antibactérienne des complexes chitosane-cuivre ont été évaluée.

Tous les résultats montrent que les complexes formés, en particulier ceux de rapport molaire près de 1 : 1 sont des candidats potentiels comme nouveaux agents antibactériens pouvant être utilisés dans la lutte contre la salmonelle et donc ils peuvent être utilisés, par exemples, comme des films protecteurs tout en contrôlant la quantité de cuivre dans le produit.

REFERENCES

1. S. Bautista-Banos, A.N. Hernandez-Lauzardo, M.G. Velazquez-del Valle, M. Hernandez-Lopez, E. Ait Barka, E. Bosquez-Molina, C.L. Wilson. Chitosan as potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities (Review). *Crop Protection* 25 (2006) 108–118
2. S. McEwen. Rapport du Comité consultatif sur l'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux et les conséquences pour la résistance et la santé humaine. Direction des médicaments vétérinaires, Santé Canada. Juin 2002
3. M. Timinouni et F. Weill. Caractérisation des plasmides portant la résistance aux céphalosporines chez les *salmonelles*. Conférence plénière C1. Les Journées Biologie et Santé de Casablanca 15-16 Décembre 2004
4. S. Senel, Susan J. McClure; Potential applications of chitosan in veterinary medicine (Review). *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 1467– 1480
5. C. Shi, Y. Zhu, X. Ran, M. Wang, Y. Su, and T. Cheng. Therapeutic potential of chitosane and its derivatives in regenerative medicine, *Journal of Surgical Research* 133 (2006) 185-192
6. B. Plouffe. Production de chitosanases modulaires munies d'un site d'attachement à la cellulose et étude de leur activité en bioréacteur. Mémoire de maître en science (M. Sc.). Université de Sherbrooke, Québec, Canada, décembre 1997, p1
7. N. Liu, X-G. Chen, H-J. Park, C-G. Liu, C-S. Liu, X-H. Meng, L-J. Yu. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers* 64 (2006) 60–65
8. H. Liu, J. Bao, Y. Du, X. Zhou, J. F. Kennedy. Effect of ultrasonic treatment on the biochemophysical properties of chitosan. *Carbohydrate Polymers* 64 (2005) 553–559
9. M. Jumaa, F. H. Furkert, B. W. Müller. A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosanq. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 53 (2002) 115–123
10. S-K. Kim, N. Rajapakse. Enzymatic production and biological activities of chitosane oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers* 62 (2005) 357–368

11. N. V. Kramareva, A. Y. Stakheev, O. P. Tkachenko, K. V. Klementiev, W. Grunert, E. D. Finashina, M. Kustov. Heterogenized palladium chitosan complexes as potential catalysts in oxidation reactions: Study of the structure. *Journal of molecular catalysis A: chemical* 209 (2004) 97-106
12. X. Yin, X. Zhang, Q. Lin, Y. Feng, W. Yu, Q. Zhang, Metal-coordinating controlled oxidative degradation of chitosan and antioxidant activity of chitosan-metal complex, *ARKIVOC* (2004) 66-78
13. G. Faúndez, M. Troncoso, P. Navarrete, et G. Figueroa. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica jejuni* and *Campylobacter*. *BMC Microbiol.* (2004) 4-19.
14. R Schmuhl, HM Krieg et K Keizer. Adsorption of Cu(II) and Cr(VI) ions by chitosan: Kinetics and equilibrium studies, *Water SA* 27 (2001), <http://www.wrc.org.za>
15. G. Cardenas, P. Orlando, T. Edelio. Synthesis and applications of chitosan mercaptanes as heavy metal retention agent. *International Journal of Biological Macromolecules* 28 (2001) 167–174
16. Y. Gao, K.H. Lee, M. Oshima, S. Motomizu. Adsorption behavior of metal ions on cross-linked chitosan and the determination of oxoanions after pre-treatment with a chitosan column. *The japan society for analytical chemistry, Analytical Sciences* 16 (2000) 1303-1308
17. K. H. Lee, Y. Muraoka, M. Oshima. S. Motomizu. Determination of heavy metals and rare earth elements in environmental samples by ICP-MS after solid phase preconcentration with chelating resin fibers and anion exchanger filters, *The japan society for analytical chemistry, Analytical sciences* 20 (2004) 183-187
18. M.S. Di Nezio, M.E. Palomeque, B.S. Fernández Band. Automated flow-injection method for cadmium determination with preconcentration and reagent preparation on-line, *Quim. Nova* 28 (2005) 145-148
19. A.J. Varma, S.V. Deshpande, J.F. Kennedy. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. *Carbohydrate Polymers* 55 (2004) 77–93
20. A. V. Kucherov, N. V. Kramareva, E. D. Finashina, A. E. Koklin, L. M. Kustov. Heterogenized redox catalysts on the basis of the chitosan matrix 1. copper complexes. *Journal of molecular catalysis A: chemical* 198 (2003) 377-389
21. R. Sulakova, A. M. F. Olivera-Campos, R. Hrdina, G. M. B. Soares. Decolourisation of an anthraquinone dye with copper complexes. P32
22. X. Wang, Y. Du, L. Fan, H. Liu, Y. Hu. Chitosan-metal complexes as antimicrobial agents: Synthesis, characterisation and structure-activity study, Springer Barlin/Heidelberg, *Polymer Bulletin*, 55 (2005) 105-113

23. X. Wang, Y. Du, H. Liu, Preparation, characterisation and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. *Carbohydrate polymers*, 56(2004)21-26
24. B. Krajewska; Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials (Review). *Separation and Purification Technology* 41 (2005) 305–312
25. K. Kurita. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin (Review). *Prog. Polym. Sci.* 26(2001)1921-1971
26. M. R. Thatte. Synthesis and antibacterial assessment of water-soluble hydrophobic chitosan derivatives bearing quaternary ammonium functionality. PHD thesis. Louisiana State University and A & M College, Baton Rouge (2004) p 2-6
27. O. Felt. Evaluation d'un polysaccharide cationique comme véhicule pour la voie ophtalmique, Thèse n° 3122 (1999). Section de pharmacie Laboratoire de pharmacie galénique et de biopharmacie. Université de Lausanne, Université de Genève. www.unige.ch/sciences/pharm/fagal/of-these.htm
28. K. Van de Velde, P. Kiekens. Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state ¹³C NMR. *Carbohydrate Polymers* 58 (2004) 409–416
29. E. Khora, L. Y. Limb. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 24 (2003) 2339–2349
30. S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, T. M. Aminabhavi. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery (Review). *Journal of Controlled Release* 100 (2004) 5 –28
31. B. Krajewska. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35 (2004) 126–139
32. J. R. Evans, W. G. Davids, J. D. Mac Rae, A. Amirbahman. Kinetics of cadmium uptake by chito-based crab shells. *Water Research* 36(2002)3219-3226
33. A. Tolaimate, J. Desbrieres, M. Rhazi, A. Alagui. Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polymer* 44 (2003) 7939–7952
34. G. Pauli. The Shrimps Cluster. April 2002
www3.wind.ne.jp/mazmoto/zeri/training/shrimp.htm
35. M. Archer. Fish Waste Production in the United Kingdom: The Quantities Produced and Opportunities for Better Utilisation. The Sea Fish Industry Authority, Seafish Report Number SR537, November 2001

36. Y-C. Chang, Y-P. SU, C-C. Chen, G. Jia, H-I. Wang, J. C. Gaston WU, J-g. Lin. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin* 25 (7) (2004) 932-936
37. K.H. Chu. Removal of copper from aqueous solution by chitosan in prawn shell: adsorption equilibrium and kinetics. *Journal of Hazardous Materials* B90 (2002) 77–95
38. I. Olabarrieta. Strategies to improve the aging, barrier and mechanical properties of chitosan, whey and wheat gluten protein films. *KTH Fibre and Polymer Technology, Akademisk Avhandling, Stockholm* (2005). p9
39. S. Babel, T. A. Kurniawan, Sandhya Babel, Tonni Agustiono Kurniawan. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review *Journal of Hazardous Materials* B97 (2003) 219–243
40. G. Crini. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Prog. Polym. Sci.* 30 (2005) 38–70
41. K.M. Peiselt da Silva, M.I. Pais da silva. Copper sorption from diesel oil on chitin and chitosan polymers, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 237 (2004) 15–21
42. A. Chandumpai, N. Singhpibulporn, D. Faroongsarng, P. Sornprasit. Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*. *Carbohydrate Polymers* 58 (2004) 467–474
43. Y. Zhang, C. Xue, Y. Xue, R. Gao et X. Zhang. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research* 340 (2005) 1914–1917
44. K. L. Morley, G. Chauve, R. Kazlauskas, C. Dupont, F. Shareck, R. H. Marchessault. Acetyl xylan esterase-catalyzed deacetylation of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers* 63 (2006) 310-315
45. W. A. Bough, W. L. Salter, A. C. M. Wu, B. E. Perkins. Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. I. Chemical composition, viscosity, and molecular-weight distribution of chitosan products. *Biotechnology and Bioengineering* 20 (2004) 1931-1943
46. P. Beaney, J. Lizardi-Mendoza, M. Healy. Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Society of Chemical Industry. journal of chemical technology and biotechnology* 80 (2004) 145-150
47. A. T. Paulino, J.I. Simionato, J. C. Garcia, J. Nozaki. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm chrysalides. *Carbohydrate Polymers* 64 (2006) 98-103

48. G. Cardenas et P. Miranda. FTIR and TGA studies of chitosan composite films, *J. Chil. Chem. Soc* 49 (2004) 291-295
49. P. Sérgio, F. Campana, R. Signini. Effects from Additives on Deacetylation of Chitin. *Polímeros* 11(2001)
50. K. V. Harish Prashanth, F. S. Kittur, R. N. Tharanathan. Solid state structure of chitosane prepared under different N-deacetylating conditions. *Carbohydrate Polymer* 50(2002) 27-33
51. G. Galed, B. Miralles, I. Panos, A. Santiago, A. Heras. N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin. *Carbohydrate Polymers* 62 (2005) 316–320
52. C-H. Chen , F-Y. Wang, Z-Pei Ou. Deacetylation of α -chitin. I. Influence of the deacetylation conditions. *Journal of Applied Polymer Science*, 93 (2004) 2416-2422
53. U. Chinadit, P. Wanichopngpan, N. Chuen How, W. F. Stevens, S. Chandkrachang. Chemical Deacetylation of shrimp chitin in different conditions. *The 3rd Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium, Keelung, Taiwan R.O.C, (1998) 165-168*
54. I. S. Lima, A. M. Lazarin, C. Airoidi. Favorable chitosan/cellulose film combinations for copper removal from aqueous solutions. *International Journal of Biological Macromolecules* 36 (2005) 79–83
55. E. Guibal; Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Separation and Purification Technology* 38 (2004) 43–74
56. E. Guibal. Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review. *Prog. Polym. Sci.* 30 (2005) 71–109
57. I. S. Lima, C. Airoidi. Interaction of copper with chitosan and succinic anhydride derivative—a factorial design evaluation of the chemisorption process. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 229 (2003) 129–136
58. M. Lavertu, Z. Xia, A.N. Serreji, M. Berrada, A. Rodrigues, D. Wang , M.D. Buschmann, A. Gupta. A validated ^1H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32 (2003) 1149-1158
59. E. Fernandez-Megia, R. Novoa-Carballal, E. Quinoa, R. Riguera. Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan by ^1H -NMR. *Carbohydrate Polymers* 61 (2005) 155–161
60. P-C. Chena, B-C. Hsieha, R. L.C. Chena, T-Y. Wanga, H-Y. Hsiaoa,

T-J. Chenga. Characterization of natural chitosan membranes from the carapace of the soldier crab *Mictyris brevidactylus* and its application to immobilize glucose oxidase in amperometric flow-injection biosensing system. *Bioelectrochemistry* 68 (2006) 72 – 80

61. J. E. Dos Santos, E. R. Dockala, E. T.G. Cavalheiro. Synthesis and characterization of Schiff bases from chitosan and salicylaldehyde derivatives. *Carbohydrate Polymers* 60 (2005) 277–282
62. M.L. Duarte, M.C. Ferreira, M.R. Marvao, Joao Rocha. Determination of the degree of acetylation of chitin materials by ¹³C CP/MAS NMR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules* 28 (2001) 359–363
63. H. Zhang, S. Schiewer. Arsenic (V) sorption on crab shell based chitosan. In: *Proceedings of ASCE EWRI World Water & Environmental Resources Congress, Anchorage, Report for 2004AK26B: Development of Crab Shell Based Biosorbents for Removing Anionic Metal Complexes From Contaminated Water.*
64. T. A. Khan, K. K. Peh. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *J Pharm Pharmaceut Sci* 5 (2002) 205-212
65. W. L. Teng, E. Khor, T. K. Tan, L. Y. Lim, S. C. Tana. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydrate Research* 332 (2001) 305–316
66. A.B. Vishu Kumara, M.C. Varadarajb, R.G. Lalithac, R.N. Tharanathan. Low molecular weight chitosans: preparation with the aid of papain and characterization. *Biochimica and Biophysica Acta* 1670 (2004) 137– 146
67. M. Fernandez Cerveraa, J. Heinamakib, M. Rasanenc, S.L. Maunuc, M. Karjalainenb, O.M. Nieto Acostaa, A. Iraizoz Colartea, J. Yliruusi. Solid-state characterization of chitosans derived from lobster chitin. *Carbohydrate Polymers* 58 (2004) 401–408
68. N. Q. Hien, D. V. Phu, N. N. Duy, H. T. Huy. Radiation grafting of acrylic acid onto partially deacetylated chitin for metal ion adsorbent. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 236 (2005) 606–610
69. X. Jiang, L. Chen, W. Zhong. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate polymers* 54(2003)457-463
70. A. Otavio Martins, E. Luiz da Silva, E. Carasek, M. C. M. Laranjeira, V. T. de Fávère. Sulphoxine immobilized onto chitosan microspheres by spray drying: application for metal ions preconcentration by flow injection analysis. *Talanta* 63 (2004) 397–403
71. M.R. Avadi, A.M.M. Sadeghi, A. Tahzibi, Kh. Bayati, M. Pouladzadeh,

- M.J. Zohuriaan-Mehr d, M. Rafiee-Tehrani. Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: Synthesis, characterization and antibacterial effects. *European Polymer Journal* 40 (2004) 1355–1361
72. C. Qin, H. Li, Q. Xiao, Y. Liu, J. Zhu, Y. Du. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers* 63 (2006) 367–374
73. E. Taboada, G. Cabrera and G. Cardenas. Retention capacity of chitosan for copper and mercury ions. *J. Chil. Chem. Soc.* 48 (2003)
74. R. Shepherd, S. Reader and A. Falshaw. Chitosan functional properties. *Glycoconjugate Journal* 14(1997) 535-542
75. B-K. Choi, K-Y. Kim, Y-J. Yoo, S-J. Oh, J-H. Choi, C-Y. Kim. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18 (2001) 553–557
76. S. P. James, P. Burt. *Viscosity of Solutions of Macromolecules*, Chem (1995) 303-51
77. M. R. Kasaai , J. Arul, G. Charlet; Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan. *Journal of polymer science part B: Polymer Physics*, 38 (2000) 2591-2598
78. P. Russo, "Intrinsic Viscosity," <http://macro.lsu.edu/HowTo/IntrinsicVisc.doc>
79. R. Hester, "Molecular Weight Determination By Dilute Solution Viscosity Measurements," <http://www.psrc.usm.edu/macrog/lab/dsvh.htm>, 2001.
80. P. Vongchan, W. Sajomsang, W. Kasinrerak, D. Subyen and P. Kongtawelert. anticoagulant activities of the chitosan polysulfate synthesized from marine crab shell by semi-heterogenous conditions. *ScienceAsia* 29 (2003) 115-120
81. L. Li et Y-L. Hsieh. Chitosan bicomponent nanofibers and nanoporous fibers. *Carbohydrate Research* 341 (2006) 374–381
82. R. Xing, S. Liu, H. Yu, Z. Guo, P. Wang, C. Li, Z. Lia et P. Li. Salt-assisted acid hydrolysis of chitosan to oligomers under microwave irradiation. *Carbohydrate Research* 340 (2005) 2150–2153
83. S. Govender, V. Pillay, D.J. Chetty, S.Y. Essack, C.M. Dangor, T. Govender. Optimisation and characterisation of bioadhesive controlled release tetracycline microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 306 (2005) 24–40
84. H-C. Ge et D-K. Luo. Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation. *Carbohydrate Research* 340 (2005) 1351–1356

85. B. Li, J.F. Kennedy, J.L. Peng, X. Yie, B.J. Xie. Preparation and performance evaluation of glucomannan–chitosan–nisin ternary antimicrobial blend film. *Carbohydrate Polymers* 65 (2006) 488–494
86. H. Zhang, S. H. Neau. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* 22 (2001) 1653-1658
87. Y. Peng, B. Han, W. Liu et X. Xu. Preparation and antimicrobial activity of hydroxypropyl chitosan. *Carbohydrate Research* 340(2005) 1846–1851
88. T. Freier, R. Montenegro, H. S. Koh, M. S. Shoichet. Chitin-based tubes for tissue engineering in the nervous system. *Biomaterials* 26 (2005) 4624–4632
89. A. Di Martino, M. Sittinger, M. V. Risbud. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering (Review). *Biomaterials* 26 (2005) 5983–5990
90. N. Onar, M. Sariisik. Using and properties biofibers based on chitin and chitosan on medical applications, Pamukkale University, Textile Engineering Department, Denizli, 20020, Turkey. http://www.ft.vslib.cz/indoczechconference/conference_proceedings/fulltext/Turkey_05.
91. J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gurny. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications: Review article. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (2004) 19–34
92. Y. Wu, Y. Dong, L. Chen, J. Huang, J. Li; Studies on lyotropic liquid-crystalline N-alkyl chitosans in formic acid. *Macromol. Biosci.* 2 (2002) 131-134
93. H. Li, Y. Dua, X. Wu, H. Zhanc. Effect of molecular weight and degree of substitution of quaternary chitosan on its adsorption and flocculation properties for potential retention-aids in alkaline papermaking. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 242 (2004) 1–8
94. F. Feng, Y. Liu et K. Hu. Influence of alkali-freezing treatment on the solid state structure of chitin. *Carbohydrate Research* 339 (2004) 2321–2324
95. K. Ogawa, T. Yui, K. Okuyamac. Three D structures of chitosan: Mini-review. *International Journal of Biological Macromolecules* 34 (2004) 1–8
96. K. Ogawa et K. Oka. X-ray Study of Chitosan-Transition Metal Complexes. *Chem. Mater.* 5 (1993) 726-728
97. E. Guibal. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review, *Separation and Purification Technology* 38 (2004) 43–74

98. L. Payet , A. Ponton , F. Agnely ,P. Colinart , J.L. Grossiord. Caractérisation rhéologique de la gélification d'alginate et de chitosane : effet de la température. *Rhéologie*, 2 (2002) 46-51
99. K.A. Janes, P. Calvo, M.J. Alonso. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47 (2001) 83–97
100. R. A.A. Muzzarelli, F. Orlandini, D. Pacetti, E. Boselli, N. G. Frega, G. Tosi, C. Muzzarelli; Chitosan taurocholate capacity to bind lipids and to undergo enzymatic hydrolysis: An in vitro model. *Carbohydrate Polymers* 66 (2006) 363-371
101. S. Gogev, M. F. Versali, E. Thiry. Les chitosanes – nouveaux adjuvants pour la vaccination par voie muqueuse chez les animaux. *Ann. Méd. Vét.* 147(2003) 343-350
102. I. Yamaguchia, S. Itohe, M. Suzukie, M. Sakanef, A. Osakac, J. Tanakaa. The chitosan prepared from crab tendon I: the characterization and the mechanical properties. *Biomaterials* 24 (2003) 2031–2036
103. M. L. Arrascuea, H. Maldonado Garciaa, O. Hornaa, E. Guibal. Gold sorption on chitosan derivatives. *Hydrometallurgy* 71 (2003) 191–200
104. C-C. Lin, H-L. Lin. Remediation of soil contaminated with the heavy metal (Cd²⁺). *Journal of Hazardous Materials A122* (2005) 7–15
105. K. Chandra Sekhar, C.T. Kamala, N.S. Chary, Y. Anjaneyulu. Removal of heavy metals using a plant biomass with reference to environmental control. *Int. J. Miner. Process.* 68 (2003) 37– 45
106. S. Pradhan, S. S. Shukla, K. L. Dorris. Removal of nickel from aqueous solutions using crab shells. *Journal of Hazardous Materials B125* (2005) 201–204
107. A. O. Martins, E. L. da Silva, E. Carasek, N. S. Gonçalves, M.C. M. Laranjeira, V. T. de Fávère. Chelating resin from functionalization of chitosan with complexing agent 8-hydroxyquinoline: application for metal ions on line preconcentration system. *Analytica Chimica Acta* 521 (2004) 157–162
108. R. K. Katarina, T. Takayanagi, M. Oshima, S. Motomizu. Synthesis of a chitosan-based chelating resin and its application to the selective concentration and ultratrace determination of silver in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* 558 (2006) 246-253
109. A. A. Atia. Studies on the interaction of mercury(II) and uranyl(II) with modified chitosan resins. *Hydrometallurgy* 80 (2005) 13–22
134. L. Chen, Y. Du, X. Zeng. Relationships between the molecular structure and

moisture-absorption and moisture-retention abilities of carboxymethyl chitosan II. Effect of degree of deacetylation and carboxymethylation. Carbohydrate Research 338 (2003) 333–340

111. B. Krajewska; Diffusion of metal ions through gel chitosan membranes. Reactive & Functional Polymers 47 (2001) 37–47
112. M. Rinaudo. Chitin and chitosan: Properties and applications. Prog. Polym. Sci. 31 (2006) 603–632
113. C. Jeon, K. Ha Park. Adsorption and desorption characteristics of mercury(II) ions using aminated chitosan bead. Water Research 39 (2005) 3938–3944
114. M. Jaworska, K. Kula, P. Chassary et E. Guibal. Influence of chitosan characteristics on polymer properties: II. Platinum sorption properties. Polym Int 52 (2003) 206–212
115. C. Y. Cheng et Y-K. Li. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. Biotechnol. Appl. Biochem. 32 (2000) 197–203
116. N.V. Kramareva, E.D. Finashina, A.V. Kucherov, L.M. Kustov. Copper Complexes Stabilized by Chitosans: Peculiarities of the Structure, Redox, and Catalytic Properties. Kinetics and Catalysis, 44 (2003) 793-800(8)
117. L-Y. Zheng, J-F. Zhu. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. Carbohydrate Polymers 54 (2003) 527–530
118. J. Holappa, M. Hjalmsdottir, M. Masson, O. Runarsson, T. Asplund, P. Soininen, T. Nevalainen, T. Jarvinen. Antimicrobial activity of chitosan N-betainates: Short communication. Carbohydrate Polymers 65 (2006) 114-118
119. G. Coward-Kelly, F. K. Agbogbo, M. T. Holtzaple. Lime treatment of shrimp head waste for the generation of highly digestible animal feed. Bioresource Technology 97 (2006) 1515-1520
120. J. da Rocha Filho, E. E. Bach, C. R. Barrak, A. A. A. DE Queiroz. Novel material for nickel recuperation. Mat. Res. 4 (2001)1516-1439
121. B. Li, Z. Zhang, W. Liu. Flow-Injection chemiluminescence determination of manganese (II) in natural water with solid sodium bismuthate as an oxidant. The japan society for analytical chemistry, Analytical science, 17(2001) 1347-1349
122. A. B. Vishu Kumar, L. R. Gowda et R. N. Tharanathan. Non-specific depolymerization of chitosan by pronase and characterization of the resultant products. Eur. J. Biochem. 271(2004) 713-723

123. J. N. Butler, D. R. Cogley. IONIC EQUILIBRIUM-Solubility and pH calculations. Chap 4, p 499-501. New York, JOHN WILEY & Sons(1998)
124. N. Ben-Shalom, N. Kudabaeva, M. Borisover. Copper-binding efficacy of water-soluble chitosans: characterization by aqueous binding isotherms. *Chemosphere* 59 (2005) 1309–1315
125. R.G. Willaert et G.V. Baron. Gel entrapment and micro-encapsulation: methods, applications and engineering principles. Vrije Universiteit Brussel. *Reviews in Chemical Engineering* 12 (1996) 5-205.
126. J.J. Wijnkera, G. Koop, L.J.A. Lipman. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. *Food Microbiology* 23 (2006) 657– 662
127. C. E. Alupoaei, L. H. García-Rubio. An interpretation model for the UV-VIS spectra of microorganismes. *Chemical Engineering Communications Manuscript No: 205-2*. In Press (2004)
128. Shuiping Chen, Guozhong Wu, Hongyan Zeng. Preparation of high antimicrobial activity thiourea chitosan–Ag⁺ complex. *Carbohydrate Polymers* 60 (2005) 33– 38
129. R. Muzzarelli, R. Tarsi, O. Filippini, N. Giovanetti, G. Biagini, P. E. Varaldo. Antimicrobial Properties of N-Carboxybutyl Chitosan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34 (1990) 2019-2023
130. A. Speciale, R. Musumeci, G. Blandino, I. Milazzo, F. Caccamo, G. Nicoletti. Minimal inhibitory concentrations and time-kill determination of moxifloxacin against aerobic and anaerobic isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents* 19 (2002) 111–118
131. H. J. Motulsky. *Biostatistique: une approche intuitive*. Traduction de la 1^{re} édition anglaise par M. Dramaix-Wilmet et F. Nackers. De Boeck Université (2002) ISBN 2744500925
132. S. Chen, G. Wu, D. Long, Y. Liu. Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan–Ca₃V₁₀O₂₈ complex membrane. *Carbohydrate Polymers* 64 (2006) 92-97
133. N. Sakkayawong, P. Thiravetyan, W. Nakbanpote. Adsorption mechanism of synthetic reactive dye wastewater by chitosan. *Journal of Colloid and Interface Science* 286 (2005) 36–42
135. J.E. dos Santos, E. R. Dockal, E. T.G. Cavalheiro. Synthesis and characterization of Schiff bases from chitosan and salicylaldehyde derivatives. *Carbohydrate Polymers* 60 (2005) 277–282
136. V. S. Andrade, B. de Barros Neto, K. Fukushima et G. M. de Campos-Takaki. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by

- Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) -A factorial study. Rev Iberoam Micol 20 (2003) 149-153
137. A. B. Dhanikula, et R. Panchagnula. Development and Characterization of Biodegradable Chitosan Films for Local Delivery of Paclitaxel. *AAPS J.* 2004; 6 (3): article 27
 138. L. S. Guinesi, E. T. G. Cavalheiro. Influence of some reactional parameters on the substitution degree of biopolymeric Schiff bases prepared from chitosan and salicylaldehyde. *Carbohydrate Polymers* 65 (2006) 557–561
 139. I. Y. Kimura, V. T. Fávere, A. O. Martins, V. A. Spinelli et A. Josué. Adequacy of isotherm adsorption of black 5 reactive dye for crosslinked chitosan microspheres. *Acta Scientiarum Maringá* 23 (2001) 1313-1317
 140. V. Singh, A. Tiwari, D. Narayan Tripathi, R. Sanghi. Microwave enhanced synthesis of chitosan-graft-polyacrylamide. *Polymer* 47 (2006) 254–260
 141. W.S. Wan Ngah, C.S. Endud, R. Mayanar. Removal of copper(II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads. *Reactive & Functional Polymers* 50 (2002) 181–190
 142. L. del Río Armas, N. Acosta Contreras, C. Peniche Covas, H. Peniche Agüero. Preparation and characterisation of chitosan films. Application in the sustained release of vimang. Sociedad Cubana de bioingenieria, Habana. Article T 0107(2003)
 143. L. Qun Wu, R. Ghodssi, Y. A. Elabd, G. F. Payne. Biomimetic Pattern Transfer. *Advanced functional materials.* 15 (2005)
 144. F.W. Fifield and D. Kealey. *Principles and Practice of Analytical Chemistry*, Blackwell Science Ltd, Fifth Edition (2000) p 363-378
 145. F. CHAIB KOURI. Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaine *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) (Rutaceae).Thèse de doctorat. Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne (2004) p.121
 146. A. V. Yadav et S. B. Bhise. Chitosan: A potential biomaterial effective against typhoid. *Current Science.* 87(9) (2004) 1176 -1178