

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de M'sila

Faculté des Sciences
Département de Chimie
N° :



Domaine : Sciences de la Matière
Filière : Chimie
Option : Chimie Organique

Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme
De
Master Académique en Chimie Organique
Par :

HADJAB Belkiss

Thème

**Utilisation de Biopolymères Issu des Déchets
Alimentaires dans des Formulations cosmétiques**

Devant le jury composé de :

M^r. REFFAS Abdelbaki	Président	Université Mohamed Boudiaf -M'sila
M^r. BOULEGHLEM Hocine	Rapporteur	Université Mohamed Boudiaf- M'sila
M^{me}. ZIDANE Salima	Examinatrice	Université Mohamed Boudiaf- M'sila
M^{me}. MAHDI Sara	Invitée	Université M'Hamed Bougara - Boumerdès

Année universitaire : 2023/2024



Ce document est le mémoire de master académique en chimie organique, concernant l'utilisation de biopolymères issu des déchets alimentaires dans des Formulations cosmétiques, fait par HADJAB Belkiss sous l'encadrement de Mr. BOULEGHLEM Hocine.



Remerciements

J'exprime ma gratitude envers Dieu Tout-Puissant, qui m'a accordé son soutien, une grande patience et du courage tout au long de mes années d'études difficiles. Je le remercie d'avoir guidé mes pas jusqu'à ce niveau.

*À Mon Encadrant Mr. **BOULEGHLEM Hocine***

J'ai eu l'honneur d'être parmi vos étudiants et de bénéficier de votre riche enseignement.

Vos qualités pédagogiques et humaines sont pour moi un modèle.

Votre gentillesse, et votre disponibilité permanente ont toujours suscité mon admiration.

Veillez bien monsieur recevoir mes remerciements pour le grand honneur que vous m'avez fait d'accepter l'encadrement de ce travail.

Je vous remercie pour votre accueil et vos conseils.

Mes profondes gratitude s'orientent vers Dr. ZIDANE Salima pour ses judicieux conseils et son support permanent.

Aux membres du jury

Je souhaite également exprimer ma gratitude envers les membres du jury :

Pr. REFFAS Abdelbaki, Dr. ZIDANE Salima

Pour avoir accepté de juger mon travail. Leur participation est grandement appréciée

Je dois un remerciement à tous les enseignants de La faculté de science pour leurs qualités scientifiques et pédagogiques

Je tiens à remercier chaleureusement, tous mes proches et tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont apporté leurs sollicitudes pour accomplir ce Travail.

Dédicace

*À ma Chère Mère **BAYA** A mon cher Père **YOUCEF**
Dont le mérite, les sacrifices et les qualités humaines m'ont
permis de vivre ce jour.*

*À mes Frères et mes sœurs : **Mohammed, Hadjer, Safwan,**
Mamoun, Safana Et Maria*

*À tous les gens qui m'aiment : **Imane, Ikram, Maria,**
Khadidja, Chaima, Sultana, Bouchra, Noureddine, Nesrine
et **Achwak***

H. Belkiss

Liste des abréviations et symboles

GlcNAc : N-Acétyle-D-Glucosamine

GlcN : D-Glucosamine

DD : Degré de désacétylation

DA : Degré d'acétylation

AcOH : Acide acétique

DPPH : Diphénylpicrylhydrazyle

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

HPLC : Chromatographie en phase liquide haute performance ou haute pression

IRTF : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DMF : N,N-diméthylformamide

FI : filaments intermédiaires

pI : point isoélectrique

CI50 : concentration inhibitrice de 50% des radicaux DPPH

Résumé

L'objectif de ce travail c'est l'exploitation des déchets naturels jetés comme la laine de mouton, les carapaces des crevettes, les plumes de poulet qui possèdent d'excellentes qualités qui leur font un choix pour de nombreuses applications et une excellente source durable de kératine, chitosane, qui sont des produits utiles, bénéfiques et nécessaires pour l'humanité, utilisés dans la fabrication de produits à valeur.

L'utilisation de ces déchets concourt significativement à la préservation des ressources naturelles et à la protection de l'environnement.

Du déchet au trésor ! J'ai commencé le travail par collecter les matières premières : La laine, les carapaces de crevette, les plumes, ensuite faire mes étapes expérimentales, et malgré les obstacles que j'ai rencontrés, j'ai pu-en fin- obtenir des bons résultats et réussir à réaliser mes formulations cosmétiques.

Mots clés : déchets alimentaires, matières premières, biopolymère, formulations cosmétiques.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو استغلال النفايات الطبيعية المهملة مثل صوف الأغنام وقشور الجمبري وريش الدجاج التي تتمتع بصفات ممتازة تجعلها خيارا للعديد من التطبيقات ومصدرا ممتازا للكيراتين والشيتوزان. وهي مواد أساسية، مفيدة وضرورية للإنسانية تستخدم في تصنيع المنتجات القيمة.

يساهم استخدام هذه النفايات بشكل كبير في الحفاظ على الموارد الطبيعية وحماية البيئة.

من القمامة إلى الكنز! بدأت العمل بجمع المواد الخام: الصوف، وقشور الجمبري، والريش، ثم تنفيذ خطواتي التجريبية، ورغم العوائق التي واجهتها، إلا أنني تمكنت - في النهاية - من الحصول على نتائج جيدة والنجاح في إنتاج مستحضراتي التجميلية.

الكلمات المفتاحية: المخلفات الطبيعية، المواد الخام، البوليمر الحيوي، مستحضرات التجميل.

Abstract

The objective of this work is the exploitation of discarded natural waste such as sheep wool, shrimp shells, chicken feathers which have excellent qualities which make them a choice for many applications and an excellent sustainable source of keratin, chitosan, which are useful, beneficial and necessary products for humanity, used in the manufacturing of valuable products.

The use of this waste contributes significantly to the preservation of natural resources and the protection of the environment.

From trash to treasure! I started the work by collecting the raw materials: wool, shrimp shells, feathers, then apply my experimental steps, and despite the obstacles and errors that I encountered, finally I was able obtain good results and succeed in producing my cosmetic formulations.

Key words: Naturels residues, raw material, biopolymer, cosmetic formulations.

Liste de figure

Figure I.1 : Structure chimique du chitosane	4
Figure I.2 : Procédés d'obtention de chitine et de chitosane.....	5
Figure II.1 : Les liaisons de cohésion de la kératine.....	18
Figure II.2 : Illustration montrant comment les liaisons hydrogène peuvent former une hélice alpha dans une protéine	18
Figure II.3 : Représentation schématique d'une hélice β	19
Figure II.4 : Structure des FI de la kératine α : (a) : un modèle boule et bâton de la chaîne polypeptidique, (b) : dessin schématique de la formation des filaments intermédiaires.....	20
Figure II.5 : Structure des filaments β -kératine : (a) : Un modèle boule et bâton de la chaîne polypeptidique, et illustration du feuille plissée β . (b) : Dessin schématique de la formation des filaments β -kératines	21
Figure II.6 : Structure hiérarchique de la fibre capillaire humaine	24
Figure II.7: Réduction de la laine	28
Figure II.8 : Oxydation de la laine	29
Figure III.1 : Prétraitement des carapaces de crevettes	40
Figure III.2 : Les étapes d'extraction du chitosane	41
Figure III.3 : Déminéralisation des carapaces de crevettes par HCl 2N.....	42
Figure III.4 : Étape de déprotéinisation des carapaces de crevette par NaOH 1N.....	42
Figure III.5 : Blanchiment des carapaces de crevette par l'eau oxygénée.....	42
Figure III.6 : Préparation du chitosane « désacétylation » de la chitine.....	43
Figure .1 : Les savons fabriqués à partir les différents principes actifs obtenus (a.b.c.d).....	47
Figure .2 : La crème fabriquée à partir de la solution de kératine de laine	48
Figure IV.1 : Différentes étapes de l'étude de l'activité antibactérienne.....	50
Figure IV.2 : Spectre IRTF de la chitine.....	54
Figure IV.3 : Spectre Infrarouge du chitosane	55
Figure IV.4 : Activité de piégeage du radical DPPH effectuée pour les six échantillons	58
Figure IV.5 : Histogrammes d'IC ₅₀ des six échantillons	58
Figure IV.6 : L'évaluation de pH des quatre savons pendant un mois.....	60

Liste des tableaux

Tableau II.1 : Les caractéristiques structurales d' α et β -kératine	19
Tableau II.2 : procédures de purification de kératine α et β	22
Tableau II.3 : Composition en acides aminés (résidus pour 100 résidus) des matières kératiniques représentatives d' α et β -kératine	23
Tableau II.4 : Comparaison de la composition en acides aminés entre les kératines des cheveux humains, des plumes, et de la laine.	25
Tableau II.5 : La comparaison entre l'extraction de kératine par réduction et hydrolyse alcaline	29
Tableau IV.1 : Les rendements de l'extraction de la chitine pour chaque étape.....	53
Tableau IV.2 : Caractéristiques physico-chimiques de la chitine	53
Tableau IV.2.1 : Principales bandes des spectres IRTF de la chitine	54
Tableau IV.3 : Rendement de la chitine désacétylée	55
Tableau IV.4 : Les principales bandes du spectre Infrarouge de chitosane	56
Tableau IV.5 : Tests de solubilité des différents adsorbants	56
Tableau IV.6 : Valeurs de CI_{50} des six échantillons tests pour le piégeage du radical DPPH*	57
Tableau IV.7 : Concentrations de l'activité antibactérienne et les diamètres	59
Tableau IV.8 : récapitulatifs des analyses effectuées sur les deux types de savons	61

Table de Matière

Remerciements	I
Dédicace	II
Liste des abréviations	III
Résumé / ملخص / Abstract	IV
Liste des figures	V
Liste des tableaux	VI

Introduction générale 1

Références bibliographiques	3
-----------------------------------	---

PARTIE THÉORIQUE

Chapitre I : Présentation générale du Chitosane

I. Chitosane.....	4
I.1. Structure du chitosane	4
I.1.1. Production de la chitine et du chitosane.....	4
I.1.1.1. Extraction par voie chimique :	4
I.1.1.1.1. Par voie biologique	5
I.1.2. Propriétés physicochimiques et biologiques du chitosane	6
I.1.2.1. Propriétés physicochimiques	6
I.1.2.1.a. Degré de désacétylation (DD)	6
I.1.2.1.b. Masse moléculaire	6
I.1.2.1.c. Solubilité.....	6
I.1.2.1.d. Viscosité	6
I.1.2.2. Propriétés biologiques	7
I.1.2.2.a. La Biodégradabilité	7
I.1.2.2.b. biocompatibilité	7
I.1.2.2.c. Activité antimicrobienne	7
I.1.2.2.d. Activité antioxydante	8

I.2. Principales applications	8
I.2.1. Domaine biomédical et pharmaceutique	8
I.2.2. Domaine Agricolaire	9
I.2.3. Domaine agroalimentaire	9
I.2.4. Domaine Alimentaire	9
I.2.5. Domaine Cosmétique	9
I.2.6. Environnement	9
I.3. Conclusion	10
Références Bibliographiques	11

Chapitre II : Présentation générale de la kératine

II.1. Introduction	17
II.2. Définition de la kératine	17
II.2.1. Structure de la kératine	17
II.2.2. Type de kératine :	18
II.3. Différence entre α -kératines et β -kératines	18
II.3.2. Feuillet β	19
II.4. Caractéristiques structurelles	19
II.5. Biochimie des kératines α et β	21
II.6. Sources de la kératine	23
II.6.1. Kératine des cheveux humains	23
II.6.2. Kératine de la laine	24
II.6.3. Kératine des plumes	24
II.6.4. Kératine des cornes, sabots, ongles et bec	25
II.7.1. Propriétés physico-chimiques	25
II.7.1.a. Masse moléculaire	25
II.7.1.b. Point isoélectrique	26
II.7.1.c. Comportement vis-à-vis à l'humidité	26
II.7.1.d. Dégradation de la kératine	26
II.7.2. Propriétés mécaniques	27
II.7.2.1. Viscoélasticité	27
II.7.2.2. Sensibilité à l'hydratation	27
II.7.3. Propriétés électriques	27
II.7.3.1. Biodégradation et gestion des déchets de kératine	27
II.8 Extraction de la kératine	28

II.8.1 Réduction de la laine	28
II.8.2 Oxydation de la laine	28
II.8.3 Hydrolyse de la laine par un traitement alcalin.....	29
II.9. Applications industrielles de la kératine	29
II.9. 1. L'industrie cosmétique	29
II.9. 2. L'industrie pharmaceutique	30
II.9. 3.Nanoparticules de la kératine	30
II.9. 3. 1. Administration des médicaments	30
II.9. 3. 2. Les activités anti-cancéreuses et antioxydantes	31
II.9. 4.L'hydrogel de kératine	31
II.9.5. L'hydrolysate de kératine	31
II.9. 5.1. Pansement hémostatique	31
II.9. 5.2. Régénération nerveuse	32
II.9. 6. Films de kératine.....	32
II.9. 7. Traitement du cuir et du textile.....	32
II.9. 8.Kératine comme engrais.....	32
II.10. Conclusion.....	33
Références bibliographiques	34

Partie Pratique

Chapitre III : Procédures expérimentales de l'extraction et la caractérisation

III.1. Introduction.....	39
III.1.1. Matériels et Produits	39
III 1.1.1. Matériel.....	39
III.1.1.1.2. Verrerie de laboratoire	40
III.1.2. Appareillages :.....	40
III.1.2. Méthodes.....	40
III.1.2.1. L'extraction et caractérisation du chitosane	40
III.1.2.2.1. Procédé d'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevettes.....	40
III.1.2.2.1.a. Déminéralisation :.....	41
III.1.2.2.1.b. Déprotéinisation	42
III.1.2.2.1.c. Blanchiment	42
III.1.2.2.1.d. Préparation du chitosane « désacétylation » de la chitine :	43
III.1.3. Caractérisation qualitative des produits.....	43

III.1.3.1. Teneur en eau	43
III.1.3.2. Teneur en cendres	43
III.1.3.3. Test de solubilité	44
III.1.3.4. Caractérisation par spectrophotométrie UV-visible.....	45
III.2. Préparation	45
III.2.1. Préparation de la farine de plume	45
III.2. 2. Préparation de la laine	45
III.3. L'extraction.....	45
III.3.1. Extraction de la kératine à partir des plumes	45
III. 3.2. Extraction de la kératine à partir de laine :	46
III.4. Caractérisation chimique et physique	46
III.4.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	46
III.5. Formulations inventées :	46
a. Savon à base de chitine : (100g)	46
b. Savon1 à base de kératine extraite de laine	46
c. Savon2 à base de kératine extraite de laine	47
d. Savon simple témoin (sans principe actif) : (50g)	47
III.5.2. Crème hydratante à base de kératine extraite de laine :	47
III.6. Activités biologiques	48
III.6.1. Activité antioxydante	48
III.6.2. Activité antibactérienne	49
III.7. Analyses des savons et de crème obtenus.....	50
III.7.1. Taux d'humidité	50
Références Bibliographies.....	51

Chapitre IV : Résultats Et Discussions

IV-1- Rendement en chitine	53
IV-2-Analyses physico-chimiques de la chitine	53
IV-2-1-Caractéristiques physico-chimiques de la chitine	53
IV-2-2-Caractérisation de la chitine par la spectroscopie IR	54
IV-3-Caractères de chitosane.....	55
IV-3-2-Caractérisation du chitosane	55
IV-3-3-Tests de solubilité.....	56
IV.4. Activité biologique.....	57
IV.4.1. Activité antioxydante.....	57

IV.4.2. Activité antibactérienne	59
IV.5. Résultats des analyses effectuées sur les savons et la crème	60
IV.5. 1. pH du savon	60
IV.5.2. Humidité	61
<i>Conclusion générale</i>	62

Introduction générale

Introduction générale

Introduction générale

L'activité humaine, particulièrement industrielle, produit des quantités phénoménales de déchets de crevette. Certains de ces déchets ont une grande valeur que la biotechnologie permet de matérialiser. Les déchets de la production commerciale piscicole et co-quillière et de la transformation des produits de la mer sont, synonymes de problème, mais ils offrent également d'excellentes possibilités d'exploitation. L'élimination de ces déchets a toujours été dispendieuse et a souvent eu un impact nuisible sur l'environnement. En effet, pendant longtemps, les conserveries produisaient de grande quantité de déchets qui n'étaient pas recyclés et étaient simplement rejetés à la mer et ou au sol, créant de sérieux problèmes de pollution au voisinage des sites de production. Dans toutes les parties du monde, les chercheurs scientifiques ont mené des programmes de traitement et de recyclage des déchets en développant des méthodes économiques et amies à l'environnement afin d'augmenter la valeur des crevettes (têtes et carapaces) et des plumes pour les valoriser dans divers domaines (biomédicaux, emballage, production de bioénergie et du plastique, etc.). [1-3]

Le chitosane est une substance biodégradable d'origine naturelle obtenue par la désacétylation de la chitine, qui se trouve dans l'exosquelette des crustacés. Pour favoriser l'utilisation du chitosane des exosquelettes de crustacés (crevettes, crabes, etc.) dans l'industrie pharmaceutique. [5-8]

Les plumes sont constituées de 91% de kératine, une protéine fibreuse d'une teneur élevée en cystéine d'environ (7–13%), ce qui lui confère une nature xénobiotique et une stabilité élevée en formant une structure de réseau reliée par des ponts disulfures. La kératine des plumes est une protéine insoluble d'une structure de feuille β avec un faible poids moléculaire d'environ 10 kDa. [3] Cette dernière peut être extraite à partir des plumes et exploiter comme matière première naturelle pour la production de films, d'hydrogels, de micro/nanoparticules à usage cosmétique, pharmaceutique, médical.etc. [4] La kératine hydrolysée a une bonne affinité cutanée, une bonne rétention d'humidité. Il peut être absorbé par les cheveux pour éviter les lésions capillaires, soulageant l'irritation de la peau et des cheveux causée par le tensioactif dans les préparations cosmétiques. Grâce à ses propriétés : agent naturel de soin et de réparation des cheveux, affinité et pénétrabilité élevées de kératine, apparence améliorée et formule souple, excellente solubilité (40 mg/100g d'eau), sans conservateurs, La kératine hydrolysée est largement utilisée dans les produits de soins personnels et l'industrie cosmétique haut de gamme. La kératine hydrolysée est une source naturelle à 100% (plumes), excellente solubilité, stabilité élevée, sans conservateurs. La kératine fait référence à une famille de protéines structurales fibreuses. La kératine est le matériau structurel clé qui constitue la couche externe de la peau humaine. [4]

Le travail présenté dans ce mémoire cible principalement la récupération des déchets de carapaces de crevettes et des déchets de plumes, leur exploitation pour la production du chitosane et de la kératine respectivement d'où la protection de l'environnement est un enjeu prioritaire et d'autre part, l'utilisation comme des produits cosmétiques. Mon mémoire est structuré selon deux parties :

Une partie de **synthèse bibliographique** constituée de deux chapitres :

Introduction générale

- ✓ **Le premier chapitre** s'intéresse à l'étude de la chitosane, nous avons défini, c'est quoi la chitosane et ses structures chimiques qui lui donnent des propriétés spécifiques pour leurs utilisations et applications à la vie quotidienne.
- ✓ **Le second chapitre** est consacré à l'étude de la kératine et ces dérivés, il présente ces différentes propriétés et caractéristiques ainsi que ces applications en pharmaceutique et en cosmétique.

L'autre partie d'**Étude expérimentale** est consacrée aux résultats expérimentaux et à l'exposition de l'ensemble des discussions. Elle sera subdivisée en deux chapitres : le premier, regroupe les procédures expérimentales de l'extraction et la caractérisation et le deuxième chapitre, nous exposerons les résultats et discussions.

Enfin, une conclusion générale sera présentée, ainsi que les différentes perspectives concernant ce travail.

Références bibliographiques

- [1] Pattanashetti N.A., Heggannavar G.B., Kariduraganavar M.Y. Smart Biopolymers and their Biomedical Applications. *Procedia Manuf.* 2017, 12 :263–279.
- [2] Aranaz I., Alcántara A.R., Civera M.C., Arias C., Elorza B., Caballero A.H., Acosta N. Chitosan : An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers.* 2021; 13:3256.
- [3] MokrejsP, Hutta M, Pavlackova J, Egner P. Preparation of Keratin Hydrolysate from Chicken Feathers and Its Application in Cosmetics. *J Vis Exp.* 2017 Nov 27 ;(129):56254.
- [4] Karthikeyan R, Balaji S, Sehgal PK. Industrial applications of keratins a review. *J Sci Ind Res.* 2007, 66:710–715.
- [5] Mokrejs P, Sukop S, Krejci O. Characterising keratin hydrolysates prepared from chicken feather. *Chem Listy.* 2014; 1: s26–s31.
- [6] Da Silva Alves D.C., Healy B., de Pinto L.A.A., Cadaval T.R.S., Breslin C.B. Recent Developments in Chitosan-Based Adsorbents for the Removal of Pollutants from Aqueous Environments. *Molecules.* 2021; 26:594.
- [7] P. Pradhan, A. Bajpai. Preparation and characterization of films from Chicken feathers for dye adsorption. *Materials today: proceedings.* 2020. 29(4):1204-1212.
- [8] Menezes J., dos Santos H., Ferreira M., Magalhães F., da Silva D., Bandeira P., Saraiva G., Pessoa O., Ricardo N., Cruz B. Preparation, structural and spectroscopic characterization of chitosan membranes containing allantoin. *J. Mol. Struct.* 2020, 1199 :126968.

PARTIE
THÉORIQUE

Chapitre I :
Présentation
générale
du Chitosane

I. Chitosane

Le chitosane est une fibre d'origine animale extraite de la chitine que l'on rencontre principalement dans les exosquelettes des crustacés et des mollusques. [1-3] On trouve également la chitine dans la paroi intestinale de certains insectes et dans les parois cellulaires de champignons et de certaines algues. La chitine et la chitosane présentent une structure similaire à celle de la cellulose, mais ce sont des aminopolysaccharides contenant à la fois des groupements D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine. [4,5] Le chitosane est obtenu industriellement par des réactions de désacétylation. La distinction entre les deux polymères se fait par le degré d'acétylation (DA) : tout copolymère ayant un DA inférieur à 50% est un chitosane. La principale caractéristique du chitosane par rapport aux autres polymères naturels est sa polycationicité ($pK_a = 6.2 - 6.8$, fonction du DA) qui lui permet d'interagir avec des substances anioniques comme les protéines, les polymères anioniques, les acides gras, les acides biliaires ou encore les phospholipides. [6.8] Ce biopolymère possède ainsi de nombreuses applications concrètes dans des domaines aussi variés que l'industrie pharmaceutique, la médecine, l'agriculture ou encore l'environnement. [9-10]

I.1. Structure du chitosane

Le chitosane est un polysaccharide linéaire composé de β -(1-4) poly-D-glucosamine, tandis que la chitine est composée de β -(1-4) poly (N-acétyl-D-glucosamine). Le chitosane peut être représenté par une structure chimique. [11] (Figure I.1.)

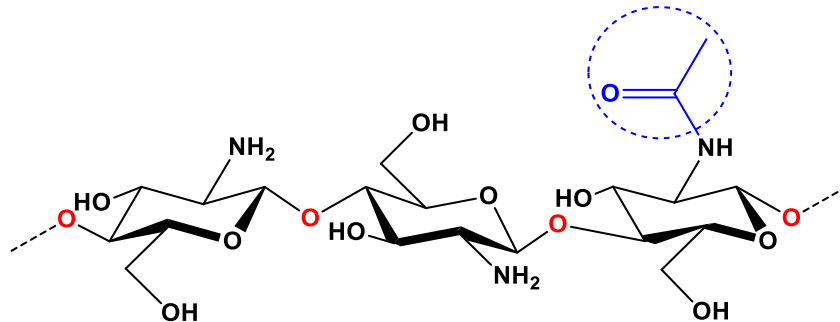


Figure I.1. Structure chimique du chitosane

I.1.1. Production de la chitine et du chitosane

Généralement, l'extraction de la chitine et le chitosane se fait avec deux voies : chimique et biologique. La méthode chimique se fait avec les acides et les bases fortes pour éliminer les minéraux et les protéines. [12]

I.1.1.1. Extraction par voie chimique :

La chitine est présente dans les co-produits sous forme de complexe chitine-protéines-minéraux (principalement du carbonate de calcium). Elle est extraite en trois étapes :

- ✓ **Déminéralisation par hydrolyse acide** pour éliminer les minéraux.
- ✓ **Déprotéinisation par hydrolyse basique** pour éliminer les protéines.
- ✓ **Décoloration (ou blanchiment)** : étape facultative pour éliminer les pigments.

Entre ces différentes étapes, des opérations de lavage sont nécessaires. La chitine peut ensuite être désacétylée pour obtenir le chitosane : par voie chimique à haute température par une base minérale concentrée, par voie enzymatique avec la chitine-désacétylase. La frontière

entre chitosane et chitine correspond à un degré de désacétylation (DD) de 60-70% [13] : en deçà le composé est nommée chitine, au-delà, chitosane. Contrairement à la chitine qui est insoluble en milieu acide (à pH < 6,5), le chitosane est soluble. De très nombreux dérivés bioactifs peuvent être obtenus à partir de la chitine et du chitosane par diverses réactions chimiques ou enzymatiques.

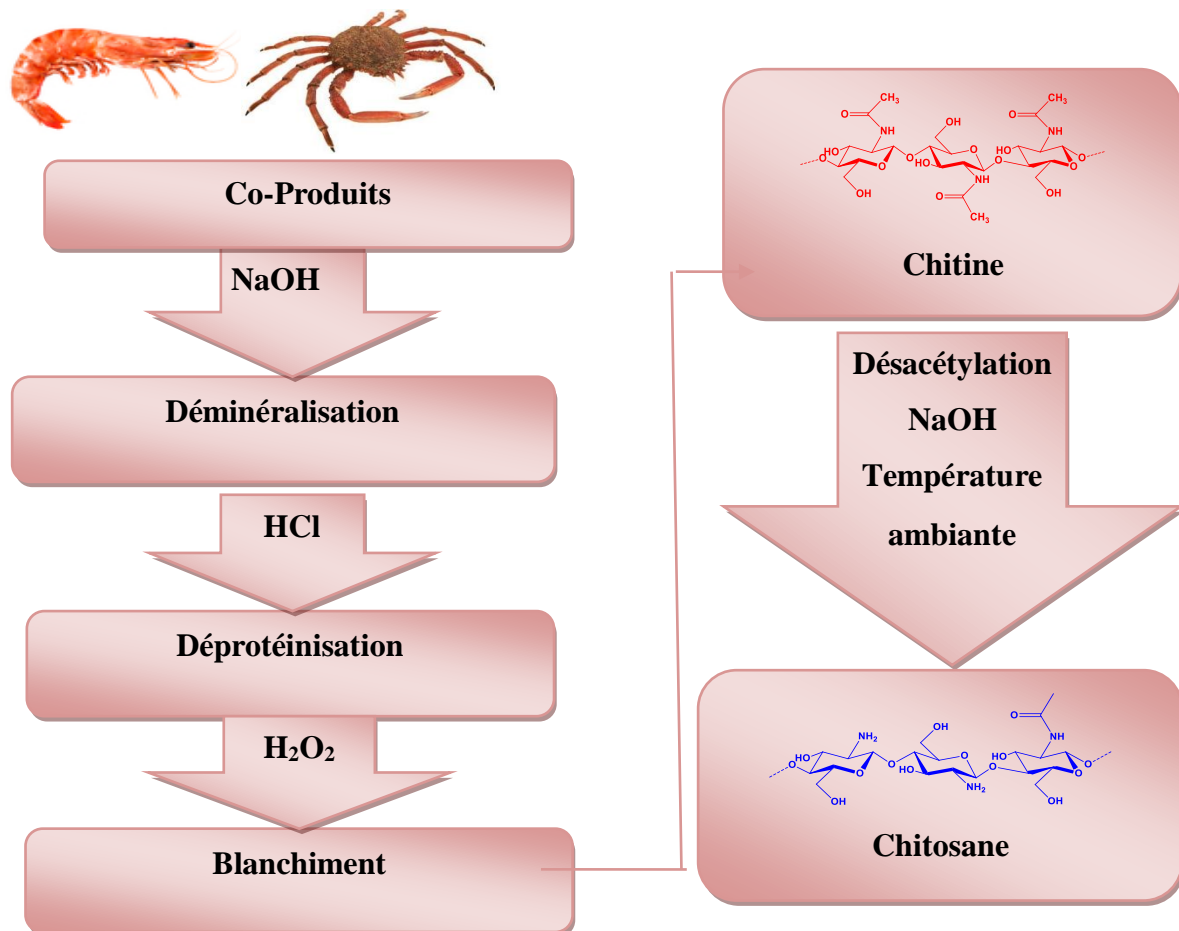


Figure. I.2.Procédés d’obtention de chitine et de chitosane [14-16]

I.1.1.1.1. Par voie biologique

Les méthodes biologiques d'extraction de la chitine ont été développées récemment. Ils peuvent utiliser des enzymes purifiées ou des microorganismes entiers pour effectuer une fermentation microbienne pour la préparation de la chitine [15], mais, plusieurs paramètres peuvent influencer l'efficacité de cette fermentation comme le pH, la température, la concentration du glucose et du carbone et le temps de fermentation [16,17]. Bien que plus respectueuses de l'environnement, ces méthodes restent moins efficaces, les principales raisons étant que : la protéine résiduelle dans la chitine produite reste souvent relativement élevée, le temps de réaction est plus long par rapport à la déprotéinisation chimique et des traitements complémentaires sont souvent nécessaires pour améliorer le degré de pureté en chitine. Ces inconvénients rendent la méthode enzymatique peu susceptible d'être appliquée à

l'échelle industrielle à moins que des progrès ne soient faits pour rendre le procédé plus efficace.

I.1.2. Propriétés physicochimiques et biologiques du chitosane

I.1.2.1. Propriétés physicochimiques

I.1.2.1.a. Degré de désacétylation (DD)

Le degré de désacétylation est le principal paramètre qui distingue la chitine du chitosane. Il est défini comme le rapport molaire des unités *D*-glucosamine et *N*-acétyl-*D*-glucosamine dans la structure du polymère. Étant donné que le degré de désacétylation dépend principalement de la méthode de purification et des conditions de réaction, il est donc essentiel de caractériser le chitosane en déterminant son DD avant son utilisation [18,19]. Plusieurs méthodes sont fournies pour déterminer le degré de désacétylation du chitosane, on cite parmi eux : le dosage UV, titrage colloïdal et RMN liquide pour des échantillons en solutions ou la spectroscopie IR, l'analyse élémentaire et la RMN sur des échantillons solides. [20,21]

I.1.2.1.b. Masse moléculaire

La masse moléculaire (MM) du chitosane est la deuxième principale caractéristique après la DD. Sa détermination qui nécessite la mise en solution du polymère, peut se faire par des mesures viscosimétriques ou par chromatographie par perméation de gel couplée à des techniques de détection comme la mesure du degré de rotation du plan de polarisation de la lumière ou de sa diffraction. La valeur de la MM d'un chitosane dépend intimement du procédé de fabrication car, celui-ci peut induire une dépolymérisation des chaînes macromoléculaires et/ou une dégradation lors de sa production [22].

I.1.2.1.c. Solubilité

Alors que la chitine est insoluble dans la plupart des solvants organiques, le chitosane est facilement soluble dans les solutions acides diluées à un pH < 6,0. Les acides organiques tels que les acides acétique, formique et lactique sont utilisés pour dissoudre le chitosane. [22,23] Le plus couramment utilisé est une solution d'acide acétique à 1% à un pH d'environ 4,0 à titre de référence [24,25]. Le chitosane est également soluble dans l'acide chlorhydrique à 1% mais insoluble dans les acides sulfurique et phosphorique. La solubilité du chitosane dans les acides inorganiques est assez limitée. Des solutions d'acide acétique concentrées à haute température peuvent provoquer une dépolymérisation du chitosane [26]. Au-dessus de pH 7,0, la solubilité du chitosane est médiocre. À pH élevé, la précipitation ou la gélification à tendance à se produire et la solution de chitosane forme un complexe poly-ion avec un hydrocolloïde anionique, ce qui entraîne la formation d'un gel [27].

I.1.2.1.d. Viscosité

La viscosité du chitosane dépend du DD de ce polymère. Plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amines libres, plus le chitosane est soluble et par voie de conséquence sa viscosité est plus importante [28]. La viscosité dépend également de la concentration du polymère (elle augmente avec la concentration), de la température (elle chute lorsque la

température augmente), du poids moléculaire (la viscosité intrinsèque augmente en fonction de l'augmentation du poids moléculaire) et enfin du pH (plus il est bas plus la viscosité est élevée) [29,30].

I.1.2.2. Propriétés biologiques

Le chitosane présente d'exceptionnelles propriétés biologiques, propriétés qui sont à la fois variées et complémentaires. [31]

I.1.2.2.a. La Biodégradabilité

La biodégradation du chitosane est assurée par des enzymes qui l'hydrolysent en oligomères. Cependant, le ou les mécanismes d'action ne sont pas encore clairement définis. Chez l'homme et les mammifères, ce rôle est assumé principalement par des lysozymes [32] qui dégradent les liaisons β -(1-4) -Glycosidiques des unités N-acétylglucosamine en des résidus N-acétylglucosamine et D-glucosamine, métabolisés ensuite dans l'organisme. Ainsi, un chitosane avec une valeur de DD égale à 50% est facilement dégradé in vivo (lysozymes) dans le sang et les tissus, sans accumulation dans le corps [33]. La dégradation dépend de l'origine et des propriétés du polysaccharide (DD, masse molaire...). L'influence de la structure cristalline, de l'agrégation des N-acétylglucosamines et de leur distribution a été aussi mise en évidence [34].

I.1.2.2.b. biocompatibilité

La biocompatibilité d'un polymère est d'une importance capitale pour une utilisation thérapeutique potentielle [35,36]. Elle est caractérisée par trois propriétés principales : sa non toxicité, sa cytocompatibilité et son hémocompatibilité [37,38]. Le chitosane présente l'avantage de réunir également d'autres propriétés très intéressantes, il agit comme un agent bactériostatique et antifongique [39,40].

I.1.2.2.c. Activité antimicrobienne

Le chitosane présente une activité antimicrobienne face aux différents groupes de microorganismes : bactéries, virus, champignons, levures et moisissures [41]. En général, les moisissures et les levures sont les plus sensibles au chitosane suivies des bactéries.

L'activité antimicrobienne du chitosane est influencée par de nombreux facteurs, incluant l'origine biologique du chitosane, le pourcentage de désacétylation (plus le chitosane est désacétylé, plus son activité antimicrobienne est forte), le degré de polymérisation ou le poids moléculaire (plus la concentration en polymères de chitosane est élevée, plus l'activité antimicrobienne est observée), ainsi que le type d'organismes ciblés. La réponse du microorganisme quant à elle, dépend de la structure chimique du chitosane utilisé et des conditions environnementales lors de l'interaction [42]. Plusieurs travaux de recherches sur le mode d'action du chitosane livrent des hypothèses sur les différentes interactions possibles entre les bactéries et le chitosane, et plus généralement sur le rôle antimicrobien de ce polymère [42,43] :

- ✓ Le chitosane, de par sa nature cationique, interagirait avec la paroi cellulaire anionique des microorganismes (interactions électrostatiques).

- ✓ Le chitosane adhère facilement aux cellules microbiennes puisque les amines chargées positivement agissent avec les charges négatives sur la membrane des cellules, libérant ainsi les constituants intracellulaires. [44]
- ✓ Le chitosane pourrait chélater des ions métalliques nécessaires à la croissance microbienne ou à la production de toxines. [45]
- ✓ Le chitosane interagit avec la membrane des cellules pour altérer sa perméabilité entravant ainsi l'entrée de certains nutriments. [42]

I.1.2.2.d. Activité antioxydante

L'utilisation du chitosane comme antimicrobien, notamment dans les filières viandes et poissons, peut être justifié par son pouvoir antioxydant plus récemment identifié. [46] Les mécanismes mis en jeu dans cette activité antioxydante du chitosane et surtout de certains de ses dérivés comme le carboxyméthylchitosane sont encore assez mal décrits et semblent être liés d'une part à leur pouvoir chélateur et d'autre part au caractère cationique de ces macromolécules.[47] Ainsi lors du stockage et/ou de la préparation de la viande, le carboxyméthylchitosane en chélatant le fer libre issu des hémoprotéines libérées va fortement ralentir le pouvoir catalyseur de ces ions sur le rancissement. [48] L'action stabilisatrice des fonctions amines du chitosane sur les aldéhydes volatiles issus de la dégradation des acides gras insaturés semble également primordiale. [49]

I.2. Principales applications

Le chitosane est un biopolymère d'une importance croissante pour l'industrie et qui a des impacts significatifs sur la recherche et le développement dans des domaines aussi variés que la chimie, la biologie, [50] la santé ou encore la protection de l'environnement. Ses propriétés exceptionnelles expliquent l'engouement pour cette macromolécule naturelle, extraite des carapaces de crustacés, considérée il y a encore peu comme des déchets. Il s'est avéré que ce co-produit d'origine marine, très bon marché, peut participer à l'élaboration de nombreux produits commerciaux à haute valeur ajoutée, et pratiquement tous les domaines d'applications industrielles, de la pharmacie à l'agroalimentaire, en passant par l'environnement, l'agriculture, le textile, la papèterie et les cosmétiques, sont concernés. Parmi ces domaines, la diététique et le biomédical sont en plein essor [51,52]. On présente ici les plus prometteuses.

I.2.1. Domaine biomédical et pharmaceutique

Les nombreuses propriétés biologiques du chitosane (biocompatibilité, bioactivité...etc.) en font un candidat de choix pour les applications pharmaceutiques, biomédicales et cliniques comme agent antimicrobien, hémostatique, pansement cicatrisant...etc.[53] Il est également utilisé comme un système de libération contrôlée d'agents thérapeutiques par voie orale, transdermique, oculaire et nasale.[54] Il présente en effet de bonnes propriétés muco-adhésives et une absence de toxicité qui le prédispose à des utilisations en thérapie génique et pour la vaccination.[55] Des études récentes tendent à montrer que le chitosane exerce un effet bénéfique sur le renforcement du système immunitaire, le contrôle du niveau de cholestérol et de sucre dans le sang, et prévient le phénomène de vieillissement.[56] Le chitosane est aussi utilisé sous forme d'hydrogels

chargés pour immobiliser des médicaments, des enzymes ou encore des substances thérapeutiques comme les vaccins, les gènes ou antigènes.[57,58]

I.2.2. Domaine Agricultural

Le chitosane est reconnu principalement pour être un éliciter de résistance contre les agents pathogènes chez les plantes ce qui réduit la croissance de champignons phytopathogènes [59]. Le chitosane pourrait devenir l'engrais naturel et le pesticide du futur en tant que bio-pesticide. Sa présence comme fertilisant accélère la croissance des plantes et améliore le rendement des cultures. En effet, l'enrobage de semences des céréales avec le chitosane leur permettent de résister aux attaques de champignons et de bactéries pathogènes [60]. De plus, le chitosane permet de conserver les aliments pour bétail et protège les animaux contre des problèmes bactériologiques ou viraux. Il permet également de lutter contre les infections respiratoires qui affectent les troupeaux bovins [61].

I.2.3. Domaine agroalimentaire

Dans les industries alimentaires, l'utilisation du chitosane n'est pas encore généralisée, à l'exception des pays asiatiques comme le Japon où de nombreux produits alimentaires enrichis en chitosane (nouilles, pâte de soja) sont trouvés [62]. Aux Etats-Unis, le chitosane est utilisé comme ingrédient fonctionnel et comme film comestible pour protéger les aliments. [63] En Europe, la réglementation sur l'utilisation du chitosane dans le domaine alimentaire est encore restrictive, il est utilisé comme un complément alimentaire. [61]

I.2.4. Domaine Alimentaire

Le chitosane est utilisé dans le domaine alimentaire pour différents besoins comme agent de préservation, agent émulsifiant, agent de texture ou supplément diététique. Grâce à ses propriétés antibactériennes, il s'est montré efficace pour éliminer les bactéries pathogènes très présentes dans le domaine alimentaire (*Salmonella*, *E. coli* et *Listeria*). La chitine partiellement désacétylée est utilisée d'une part pour désacidifier les extraits de café, les jus de fruits ou de légumes, et d'autre part pour conserver la nourriture du fait de sa capacité à immobiliser les cellules microbiennes ou fongiques. [64,65]

I.2.5. Domaine Cosmétique

Les propriétés filmogènes et cationiques du chitosane sont exploitées dans de nombreuses crèmes ou lotions de soin pour les cheveux ou la peau. Il a aussi la capacité de maintien de l'humidité de la peau, du traitement de l'acné, de l'amélioration de la souplesse des cheveux et de la réduction de l'électricité statique dans les cheveux. [66]

I.2.6. Environnement

Traitement de l'eau potable (coagulation/floculation, filtration, absorption) : [67]

- Traitement des eaux usées (coagulant).
- Traitement des eaux de piscine (agent chélatant des cations).
- Chélation des métaux toxiques et radio-isotopes.
- Récupération de métaux réutilisables.
- Agent de déshydratation des boues. [68]

I.3. Conclusion

Dans ce chapitre, on a défini, c'est quoi la chitine, le chitosane et ses structures chimiques qui lui donnent des propriétés spécifiques pour leurs utilisations et applications à la vie quotidienne. Comme on a discuté les méthodes d'extraction de ces derniers à partir des déchets alimentaires par voie chimique qui se déroule en trois phases : Une déminéralisation pour éliminer les minéraux, une élimination des protéines par une déprotéinisation suivi par une désacétylation pour obtenir le chitosane et une phase facultative de décoloration (blanchiment) pour éliminer les pigments.

Références Bibliographiques

- [1]. Kauffman G.B., Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals, *J. Chem. Educ.*, 1990, 67: pp. 938.
- [2]. Tolaimate.A; J. Desbrières ; M. Rhazi ; A. Alagui ; M. Vincendon et P. Vottero, On The Influence of Deacetylation Process on The Physicochemical Characteristics of Chitosan from Squid Chitin, *Polymer*, **1999**, pp. 2463-2469.
- [3]. Aranaz. I; Mengibar.M; Harris.R; Panos.I; Miralles.B; Acosta.N; Galed. G et Heras.A, Functional characterization of chitin and chitosane, *Current Chemical Biology*, **3**, **2009**, pp.203-230.
- [4]. Holy N.R ; Michel P & Philippe D, Les polymères issus du végétal : matériaux à propriétés spécifiques pour des applications ciblées en industrie plastique, **2006**, pp.185-196.
- [5]. K. Kurita, Chitin and chitosane: functional biopolymers from marine crustaceans, *Mar. s.l.: Biotechnol.*, **2006**, 8, pp. 203.
- [6]. Tolaimate A; Desbrieres J; Rhazi M; Alagui A, Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties, *Polymer. S. l: PISSN 0032-3861*, **2003**, (44), pp. 7939–7952.
- [7]. M. Rinaudo, Chitin and chitosan: Properties and applications, *s.l.: Prog Polymer Sci*, **2006**, 31, pp. 603–632.
- [8]. Bastiaens. L; Soetemans. L ; D’Hondt. E ET Elst. K, Sources of Chitin and Chitosan and their Isolation, *s.l.: Chitin and Chitosan*, **2019**, pp. 1–34.
- [9]. El Knidri. H; Belaabed.R; Addaou.A; Laajeb. A et Lahsini. A, Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosane, *International Journal of Biological Macromolecules*, **2018**, 120, pp. 1181–1189.
- [10]. Chen; Cheng-Ho. Deacetylation of β chitin. I. Influence of the deacetylation conditions, *Journal of Applied Polymer Science* 93.5, **2004**, pp. 2416-2422.
- [11]. Tolaimate. A ; J. Desbrières ; M. Rhazi ; A. Alagui ; M. Vincendon et P. Vottero, On The Influence of Deacetylation Process on The Physicochemical Characteristics of Chitosan from Squid Chitin, *Polymer*, **1999**, pp. 2463-2469.
- [12]. Ravi K ; M. N. V, A Review of Chitin and Chitosan Applications. Reactive and Functional polymers, **2000**, pp. 1-27.
- [13]. Aiba. S, Studies on Chitosan : Determination of the Degree of Nacetylation of Chitosan by Ultraviolet Spectrophotometry and Gel Permeation Chromatography, *International Journal of Biological Macromolecules*, **1986**, pp. 173-176.
- [14]. MarinardBiotech, Production du chitosan à partir de co-produits de crevette. Proc. Les coproduits marins des usines de transformation : une valeur à exploiter, *Rencontres technologiques du Centre Québécois de valorisation des biotechnologies*, Québec, **2003**.
- [15]. Shahidi. F, Chitin and chitosane from marine by-products. In: Maximising the value of marine by-products, *Shahidi F. Ed. Wood Head Publishing*, **2007**, pp. 340-373.
- [16]. Ospina; Sandra. Comparison of extraction methods of chitin from *Ganoderma lucidum* mushroom obtained in submerged culture, *BioMedResearch International*, **2014**, pp. 169071-169078.

- [17]. LeRoux. K, Rapport d'avancement de thèse : « Application de l'hydrolyse enzymatique pour l'extraction de la chitine », *Documentation interne Ifremer*, **29/10/2009**, pp. 53-60.
- [18]. A. C. M. Wu ; W. A. Bough ; M. R. Holmes et B. E. Perkins, Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. III. Coagulation of Cheese whey solids, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 20, no 12, **1978**, pp. 1957-1966.
- [19]. N. Pareek ; V. Vivekanand ; S. Saroj ; A. K. Sharma et R. P. Singh, Purification and Characterization of chitin deacetylase from *Penicilliumoxalicum* SAEM-51, *Carbohydrate Polymers*, vol. 87, no 2, **2012**, pp. 1091-1097.
- [20]. A. Tolaimate; J. Desbrieres; M. Rhaziet A. Alagui, Contribution to the preparation of Chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties, *Polymer*, vol. 44, no 26, **2003**, pp. 7939-7952.
- [21]. W. Arbia; L. Arbia; L. Adour ET A. Amrane, Chitin extraction from crustacean shells Using biological methods -A review, *Food Technology and Biotechnology*, vol. 51, no 1, **2013**, pp. 12-25.
- [22]. A. K. Pate ; P. Michaud ; H. de Baynast ; M. Grédiac et J.D. Mathias, Preparation of chitosan-based adhesives and assessment of their mechanical properties, *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 127, n° 5, **2013**, pp. 3869-3876.
- [23]. Blackwell J, chitin In: Biopolymers, *Walton AG, Blackwell J, Eds. New York: Academic Press 474, 1973*.
- [24]. Kurita K, Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans, *Marine Biotechnology*, 8, **2006**, pp. 203-226.
- [25]. AbdulhadiAljawish, Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physicochimiques de ces nouveaux bio polymères, *Thèse de doctorat. Université de Lorraine, 2013*.
- [26]. G.A.F. Roberts, Structure of chitin and chitosan. In: Chitin chemistry, edited by G.A.F. Roberts. *Mac Millan Press.Houndmills, 1992*, pp. 1-53.
- [27]. PR. Austin, Chitin solvents and solubility parameters in: Chitin and chitosane and related enzymes, *ZikakisJ P, ed. Orlando: Academic Press, 1984*, p 227.
- [28]. W. Wang ET D. Xu, Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degree of désacétylation, *Int. J. Biol. Macromol*, 16 (3), **1994**, pp. 49-152.
- [29]. R. H. Chen. Et M. L. Tsaih, Effect of temperatures on the intrinsic viscosity and conformation of chitosan in dilute HCl solution, *Int. J. Biol. Macromol*, 23, **1998**, pp. 135-141.
- [30]. G. Berth; H. Dautzenberget M. G. Peter, Physico-chemical characterization chitosansvarying in degree of acetylation, *Carbohydrate Polymers*, 36, **1998**, pp. 205-218.
- [31].Ye. M ; Neetoo. H ET Chen. H, Effectiveness of chitosan-coated plastic films incorporating antimicrobials in inhibition of *Listeriamonocytogenes* on cold-smoked salmon, *International Journal of Food Microbiology*, 127(3), **2008**, pp. 235-240.
- [32]. Chen. SC; Lu. Y, Micro and nana-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery, *Adv. Drug Delivery Rev*, **2004**, pp. 1621-1633.

- [33]. C. Chatelet; O. Damouret A. Domard, Influence of the degree of acetylation on some Biological properties of chitosan Films, *Biomater*, 22, **2001**, pp. 261-268.
- [34]. Xuan Jiang; Lirong Chen; WeiZhong, A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosane, *Carbohydrate Polymers*, 54, **2003**, pp. 457-463.
- [35]. Annadurai. G; Juang.R S; Lee. D L, Use of cellulose-based wastes for adsorption of dyes from aqueous solutions, *Journal of Hazardous Materials*, 92:3, **2002**, pp. 263-274.
- [36]. Crini G; Badot P M, Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature, *Progress in Polymer Science*, 33, **2008**, pp. 399-447.
- [37]. Zhang G; Yi L; Deng H; Sun P, Dyes adsorption using a synthetic carboxymethyl cellulose-acrylic acid adsorbent, *Journal of Environmental Sciences*, 26 (5), **2014**, pp. 1203-1211.
- [38]. Mahdavinia G ; Massoudi A ; Baghban A ; Massoumi B, Novel carrageenan-based hydrogel nanocomposites containing laponite RD and their application to remove cationic dye, *Iranian Polymer Journal*, 21, **2012**, pp. 609-619.
- [39]. SalgueiroA. M ; Daniel-da-Silva A. L ; Girao A V ; Pinheiro P C ; Trindade T, Unusual dye adsorption behavior of K-carrageenan coated superparamagnetic nanoparticles, *Chemical Engineering Journal*, 229, **2013**, pp. 276-284.
- [40]. Yang Y ; Wei X ; Wan J, Preparation, characterization and adsorption performance of a novel anionic starch microsphere, *Molecules*, 15(4), **2010**, pp. 2872-2885.
- [41]. Fernandez-Saiz. P; Soler. C ; LagaronJ. M et OcioM. J, Effects of chitosane films on the growth of *Listeriamonocytogenes*, *Staphylococcusaureus* and *Salmonellaspp.* In laboratory media and in fish soup, *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), **2010**, pp. 287-294.
- [42]Chatterjee S, Lee M W, Woo S H. Influence of impregnation of chitosan beads with cetyltrimethyl ammonium bromide on their structure and adsorption of Congo red from aqueous solutions. *Chem. Eng. J.***2009**, 155, 254– 259
- [43]. Gomez-Estaca.J; Lopez de Lacey.A; Gomez-Guillen.M.C; Lopez-Caballero. M.E et Montero P, Antimicrobial Activity of Composite Edible Films Based on Fish Gelatin and Chitosan Incorporated with Clove Essential Oil, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **18**(1), **2009**, pp. 46-52.
- [44]. KimS.K. EtMendis E, Bioactive compounds from marine processing byproducts. A review, *Food Research International*, **39**, **2006**, pp. 383-393.
- [45]. T. Khan A; Peh. K. K andC'ing, Mechanicalbioadhesive strength and biological evaluation of chitosan films for wound dressing, *Journal of Pharmaceutical and Pharmaceutical Science*, 3(3), **2000**, pp. 3003–3371.
- [46]. Hafsa. J; Smach. M. A; Charfeddine. B; Limem.K; Majdoub.H &Rouatb. S, Antioxidant and antimicrobial proprieties of chitin and chitosan extracted from *ParapenaeusLongirostris* shrimp shell waste, *AnnalesPharmaceutiquesFrançaises*, 74(1), **2016**, pp. 27–33.
- [46]. Prabu. K; Natarajan. E, In vitro antimicrobial and antioxidantactivity of chitosan isolated from *PodophthalmusVigil*, *J ApplPharmaSci*, 2(9), **2012**, pp. 75—82.
- [47]. Xie W ; Xu P ; Liu Q, Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives, *Bio org Med ChemLett*, 11, **2001**, pp. 1699-1701.

- [48]. Yen MT ; Tseng YH ; Li RC ; Mau JL, Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stipes, *Food SciTechnolInt*, 40, **2004**, pp. 255- 261.
- [49]. Yen MT; Yang J; Mau J, Antioxidant properties of chitosan from crab shells, *CarbohydrPolym*, 74, **2008**, pp. 840- 844.
- [50]. Crini G. ; Badot P.M. et Guidal E, Chitine et chitosane. Du biopolymère à l'application, *Presses universitaires de Franche-Comté*, **2009**, pp. 308-325.
- [51]. Ravi Kumar M.N.V, A review of chitin and chitosan applications, *Reactive and Functional Polymers*, 46, **2000**, pp. 1-20.
- [52]. G. Jak. M. Stephen.winterowd and A. Paul. Sandford, Chitin and chitosane, edited by Alistair.Food polysaccharides and their application, *Edition Marcel. Dekker*, NewYork, **1995**.
- [53]. Zhang. J; Xia.W; Liu.P; Cheng.Q; Tahirou. T; GU. W ET Bo L, Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications, *Marine drugs*, 8, **2010**, pp. 1962-1987.
- [54]. Rauch. F ; Dronish. M, Chitosan in : An introduction to biomaterials, *Guelcher SA, Hollinger JO, eds. CRC press*, 14, **2006**, pp. 249-255.
- [55]. Jayakumara R ; Menona D ; Manzoora NK ; Naira SV ; Tamurab H, Biomedical applications of chitin and chitosan based nanoma-terials, *CarbohydrPolym*, 82, **2010**, pp. 227-232.
- [56]. Felse PA ; Panda T, Studies on applications of chitin and its derivatives, *Bioprocess Eng*, 20, **1999**, pp. 505-512.
- [57]. Shahidi F; Arachchi JKV; Jeon YJ, Food applications of chitin and chitosane, *Trends Food SciTechnol*, 10, **1999**, pp. 37-51.
- [58]. A. Youcefi ET F Riazi, Extraction, and Physicochemical Characterization and in Vitro Antioxidative Potential of Chitosan in Shrimp Shell Waste from BeniSaf Sea, Algeria, *s.l.: International Journal of Science and Research*, 3, **2012**, pp. 955-959.
- [59]. OSandra, Comparison of extraction methods of chitin from Ganoderma lucidum mushroom obtained in submerged culture, *BioMed Research International*, **2014**, pp. 169071-169078.
- [60]. F Ronny, Chitin sponge, extraction procedure from shrimp wastes using green chemistry, *Journal of Applied Polymer Science* 104.6, **2007**, pp. 3909-3916.
- [61]. Chen; Cheng-Ho, Deacetylation of β -Chitin. I. Influence of the deacetylation conditions, *Journal of Applied Polymer Science* 93.5, **2004**, pp. 2416-2422.
- [62]. GrégorioCrini ; Pierre-Marie Badot ; Éric Guibal, Chitine et chitosane : du biopolymère à l'application, *Presses universitaires de Franche-Comté*, **2009**.
- [63]. Crini G, Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review, *Bioresource Technology*, 97, **2006**, pp. 1061-1085.
- [64]. Fan. W; Sun. J; Chen.Y; Qiu.J; Zhang. Y and Chi. Y, Effects of chitosane coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage, *Food Chemistry*, 115(1), **2009**, pp. 66-70.
- [65]. Koide S.S, Chitin and chitosan: properties, benefits and risks, *Nutrition Research*, 6, **1998**, pp. 1091-1111.
- [66]. Casadidio. C; Peregrina.D V; Gigliobianco.M R; Deng.S; Censi. R ET Martino P, Chitin and Chitosans: Characteristics, Eco-Friendly Processes, and Applications in Cosmetic Science, *Mar. Drugs*, 17, **2019**, pp. 369-375.

- [67]. Peter M.G, Applications and environmental aspects of chitin and chitosane, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A32, **1995**, p 629.
- [68]. Vakili M, Rafatullah M, Ibrahim M H, Abdullah A Z, Salamatinia B, GholamiZ. Chitosan hydrogel beads impregnated with hexadecylamine for improved reactive blue 4 adsorption. *Carbohydr.Polym.***2016**, 137, 139– 146,

Chapitre II
Présentation
générale
de la kératine

II.1. Introduction

La kératine est présente chez presque tous les vertébrés. Elle est issue de la kératinisation des cellules mortes de la peau en s'accumulant dans la couche superficielle.[1,2] Considérée comme étant le troisième biopolymère non toxique le plus abondant dans l'environnement après la cellulose et la chitine avec des propriétés uniques de biodégradabilité et de biocompatibilité, elle a connu un grand intérêt de la part des chercheurs qui ont réalisé un massif travail en étudiant la caractérisation structurale, la composition chimique, et les propriétés biochimiques/physicochimiques...[3,4] Ceci a abouti au développement de diverses formes de kératine (gels, films, nano/microparticules), qui ont été exploitées dans divers domaines industriels (pharmaceutique, cosmétique, médical, etc.).[5]

II.2. Définition de la kératine

Le mot kératine fut apparaître pour la première fois dans la littérature vers 1850 pour décrire le matériau qui composait les tissus durs comme les cornes d'animaux et les sabots (la kératine vient du grec « kera » signifiant corne). [6] La kératine est une protéine fibreuse riche en soufre. C'est une molécule insoluble qui représente les principaux constituants structuraux des phanères : (cheveux, ongles, griffes, sabots, écailles, plumes, cornes, bec, etc.). [7] Elle fournit un moyen de défense et une fonction de protection dans l'adaptation des vertébrés vis-à-vis l'environnement extérieur. [8]

II.2.1. Structure de la kératine

La kératine est un biopolymère complexe d'une structure fibreuse construite à partir d'hélices α (α -kératine) ou des feuilles β plissées (β -kératines) maintenues ensemble par des liaisons hydrogène (H) et des ponts disulfures (S-S). [7] La présence des liaisons disulfures et hydrogène dans la kératine lui confère une stabilité mécanique, rigidité extraordinaire et résistance à la dégradation par les enzymes protéolytiques comme la trypsine, la pepsine et la papaïne. **(figure1.1)** Cependant, la présence des groupes fonctionnels réactifs, en particulier le squelette peptidique, les ponts disulfures (S-S), la fonction amine ($-\text{NH}_2$), et d'acide carboxylique ($-\text{COOH}$), rend la kératine chimiquement réactive dans des conditions favorables. [9] La chaîne d'acides aminés constituant la protéine de la kératine peut varier d'un tissu à l'autre en nombre et en séquence, ainsi qu'en polarité, charge et taille, ce qui influence leurs propriétés et leur fonction. [10] **(Figure. II.1)**

II.3.2. Feuillet β

Le feuillet β est autre structure secondaire où les chaînes primaires ne s'enroulent pas mais il se forme des liaisons hydrogène entre les chaînes voisines disposées parallèlement les unes par rapport aux autres et l'ensemble forme un feuillet plissé. (**Figure. II.3**)

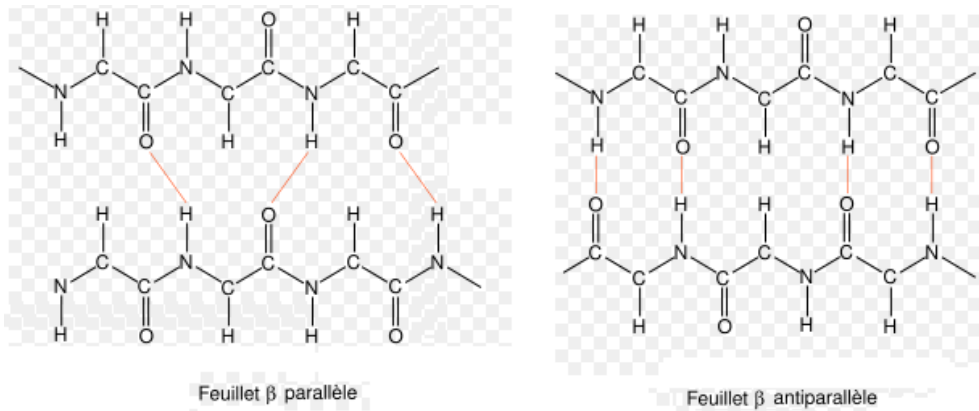


Figure. II.3 : Représentation schématique d'une hélice β [4]

II.4. Caractéristiques structurelles

✓ La structure filament-matrice (**Tableau. II.1**)

Tableau II.1 : Les caractéristiques structurelles d' α et β -kératine [8]

	α -Kératine	β -kératine
Similitude : caractéristique structurelle	Structure à matrice filamenteuse : FI et filaments β -kératine incorporés dans une matrice amorphe. Les FI et les filaments β -kératine génèrent des diagrammes de diffraction des rayons X caractéristiques.	
Diamètres des filaments	FI : ~7(nm) Basé sur une structure hélicoïdale	Filaments de β -kératine : 3–4 (nm). Basé sur une structure en feuille plissée β
Masse moléculaire	(40–68 kDa).	(10-22 kDa).
Constituants des protéines	La matrice est constituée de protéines à haute teneur en soufre et en glycine – tyrosine, alors que les FI se composent de plusieurs types de protéines.	Le filament et la matrice sont incorporés dans une seule protéine.
Rigidité	Élevée	Moins rigide que l' α kératine

Les chaînes d'hélices individuelles et intrinsèquement flexibles dans la kératine adoptent une forme hélicoïdale qui présente les caractéristiques suivantes :

- La torsion est droitière.
- Chaque tour de l'hélice nécessite 3.6 acides aminés, soit 11 atomes de squelette.
- Les chaînes latérales s'étendent vers l'extérieur de l'hélice et interagissent donc avec l'environnement.
- La stabilité est maintenue par des liaisons hydrogènes intramoléculaires. [13]
-

La **figure. II.4.** Montre le processus de formation des FI, ce dernier passe par différentes étapes :

1. Deux chaînes α -hélices droites et isolées forment une bobine enroulée gauchère, le diamètre (45 nm de long).
2. Les dimères sont associés de bout en bout et rangés côte à côte par des liaisons disulfures afin de former un protofilament (environ 2 nm de diamètre).
3. Deux protofilaments s'associent latéralement en une protofibrille, quatre protofibrilles se combinent en FI circulaires ou hélicoïdaux d'un diamètre de 7 nm.

Les FI s'emballent dans une conformation super-enroulée et se lient aux protéines de la matrice.

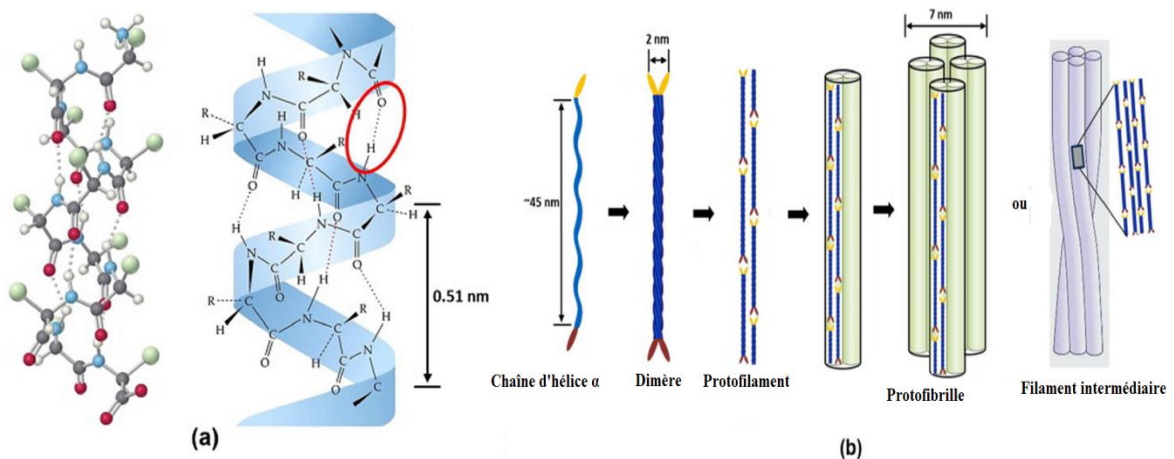


Figure. II.4 : Structure des FI (filaments intermédiaires) de la kératine α : (a) : un modèle boule et bâton de la chaîne polypeptidique, (b) : dessin schématique de la formation des FI. [8]

Pour la β -kératine, la feuille plissée se compose de β -brins emballés latéralement qui peuvent être parallèle ou antiparallèle (plus stable), et les chaînes sont maintenues ensemble par l'hydrogène intermoléculaire.

La structure de la feuille plissée est stabilisée par deux facteurs : Les liaisons hydrogène entre les β -brins contribuent à former une feuille et la planéité de la liaison peptidique oblige cette dernière à être plissée.

La **figure. II.5.** Montre le processus de formation des filaments de la β -kératine, ce dernier passe par différentes étapes :

1. La région centrale de la chaîne polypeptidique se replie pour former quatre β -brins latéraux qui se lient ensuite par des liaisons hydrogènes, résultant en une feuille plissée.

2. La feuille se déforme pour se trouver dans une hélice gauchère d'une surface réglée.
3. Deux feuilles plissées sont reliées par un diadème horizontal, se superposent et prennent deux sens opposés, formant le filament d'un diamètre de 4 nm.
4. Les parties terminales des chaînes peptidiques s'enroulent autour des filaments de β -kératine et forment la matrice.

Les kératines peuvent être considérées comme un composite polymère de filaments cristallins noyés dans une matrice amorphe.

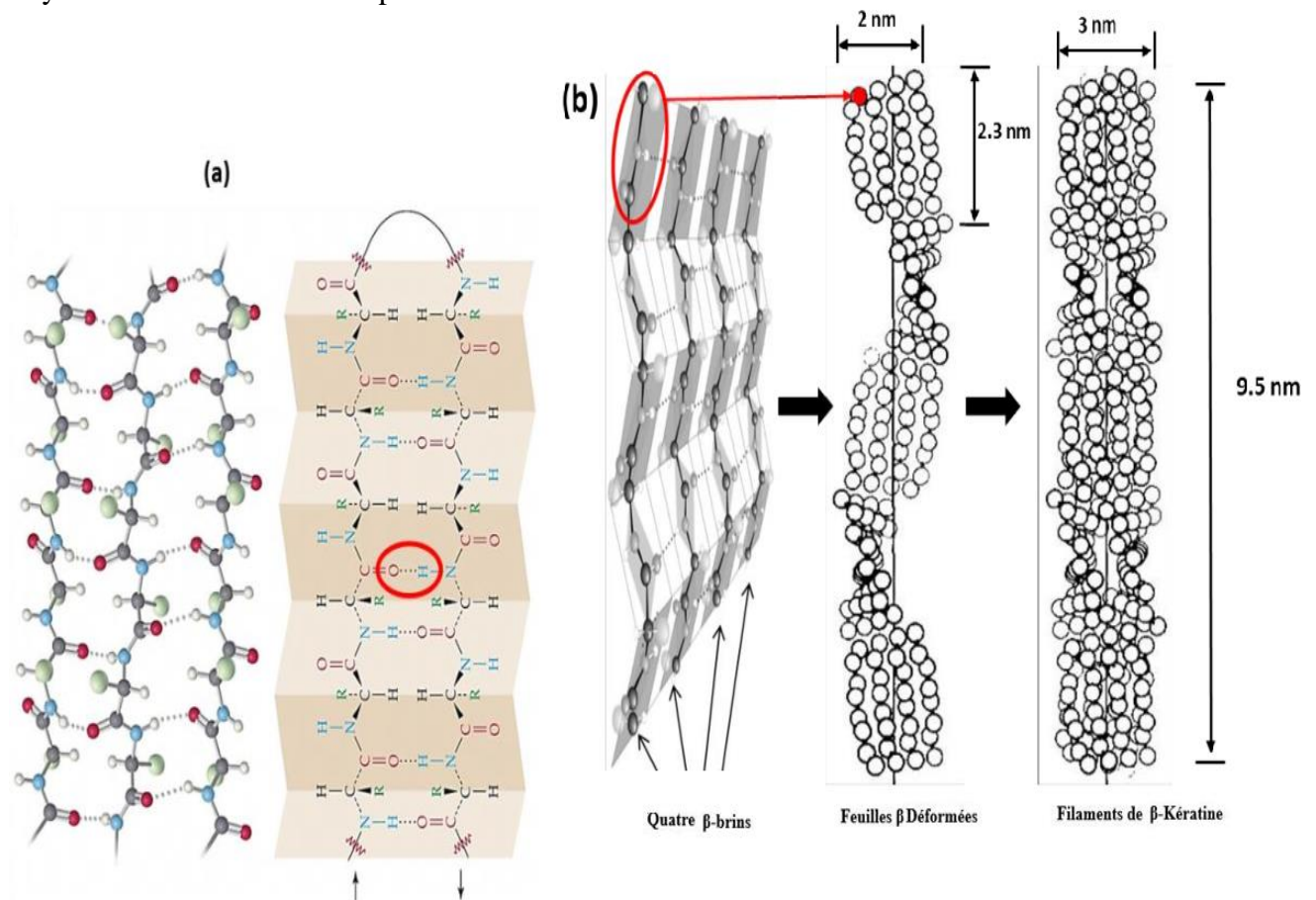


Figure. II.5 : Structure des filaments β -kératine : (a) : Un modèle boule et bâton de la chaîne polypeptidique, et illustration du feuillet plissé β : (b) : Dessin schématique de la formation des filaments β -kératines [8]

II.5. Biochimie des kératines α et β

✓ Solubilité

Due à la présence des réticulations disulfures intra et intermoléculaires, la kératine est insoluble dans tous les solvants tel que l'eau pure, les solutions aqueuses acides ou basiques et les solvants organiques. Par conséquent, la dissolution et l'extraction de la kératine sont difficiles par rapport à d'autres polymères naturels, tels que le collagène ou l'amidon. [14] La protéine de la kératine est soluble dans des solutions contenant des agents dénaturants, comme l'urée. [10]

Plusieurs procédures de purification ont été développées pour obtenir des dérivés de kératine. Pour les α kératines, des méthodes de réduction, d'oxydation et de sulfitylolyse ont été

utilisées, tandis que pour les β kératines le thioglycolate alcalin et une combinaison d'un réactif de rupture de liaison disulfure et d'un dénaturant protéique ont été décrits dans la littérature. (**Tableau. II.2**)

Tableau. II.2: procédures de purification de kératine α et β [8]

α - kératine	β -kératine
Réduction : par le thioglycolate de potassium dans l'urée pour obtenir 80 à 97% de kératine à partir de la corne, du sabot, des cheveux, et par électrophorèse sur gel d'amidon en fractions riches et pauvres en soufre.	Thioglycolate alcalin : par le thioglycolate de sodium dans l'absence d'oxygène à pH = 11 pour obtenir 80 à 90% de kératine de plumes
Oxydation : en traitant la laine avec de l'acide peracétique et un alcalin dilué. Sulfitolyse : par bisulfite de sodium avec de l'urée et un agent oxydant	Sulfitolyse : Combinaison d'un réactif de rupture de liaison disulfure et d'un dénaturant protéique

✓ **Composition en acides aminés :**

L'analyse des acides aminés a été réalisée par l'hydrolyse acide des protéines et la chromatographie d'échange d'ions automatisée. Les kératines α et β ont une teneur élevée en cystéine et une très faible teneur en histidine et en méthionine, cependant les α -kératines sont plus riches en cystéine et d'acide glutamique tandis que les β -kératines sont plus riche en alanine et en glycine, proline et sérine. (**Tableau. II.3**).

Tableau. II.3 : Composition en acides aminés (résidus pour 100 résidus) des matières kératiniques représentatives d' α et β -kératine [8]

	Laine (représentant la α - kératine)	Rachis de plumes (représentant la β - kératine)
Alanine	5.5	8.7
Arginine	6.6	3.8
Acide aspartique (y compris l'asparagine)	6.5	5.6
Cystéine	11.4	7.8
Acide glutamique (y compris la glutamine)	11.3	6.9
Glycine	8.8	13.7
Histidine	0.8	0.2
Isoleucine	3.4	3.2
Leucine	7.8	8.3
Lysine	3.0	0.6
Méthionine	0.5	0.1
Phénylalanine	2.5	3.1
Proline	6.0	9.8
Sérine	9.6	14.1
Thréonine	6.1	4.1
Tyrosine	4.1	1.4
Valine	5.9	7.8
Tryptophane	/	0.7

II.6. Sources de la kératine [15]

La kératine et selon sa teneur en soufre est divisée en deux catégories :

- **Kératine trichocytaire** : également appelée kératine dure avec une teneur élevée en soufre (~ 5%). Elle se trouve dans les structures liées à l'épiderme telles que la laine, les poils, les plumes, et les ongles ainsi que les cornes et les sabots des mammifères, des reptiles et des oiseaux. Elle contient une teneur élevée en cystéine (4–17%) et faible en glycine.

Contrairement à la kératine molle, la kératine dure possède une durabilité et une résistance structurelles et agisse comme échafaudage structurel.

- **Kératine épithéliale** : également appelée kératine molle avec une faible teneur en soufre (~1%). Elle se trouve dans la couche cornée de la peau, et a une faible teneur en cystéine (<3%). La kératine molle stabilise les cellules de l'épithélium.

II.6.1. Kératine des cheveux humains

Les kératines des cheveux humains sont classées comme des kératines dures, composées de 65 à 96% de protéines, de 1 à 9% de lipides, de 3% de mélanine et de composés mineurs, qui dépendent de la teneur en humidité. Les fibres des cheveux humains (**Figure. II.6**) contiennent trois parties distinctes : la cuticule, le cortex et la moelle, dont :

- La cuticule, qui constitue les couches externes des fibres capillaires, est principalement composée de 5 à 12% β -kératines en couche protégeant les couches internes et retenant l'humidité.
- Le cortex est principalement composé d' α -kératines (50-60%), kératines γ (20-30%), et des granules de mélanine piégés à l'intérieur des brins de cortex représentant ainsi 70 à 95% de la masse totale des cheveux.
- La moelle est une partie poreuse de certaines fibres capillaires humaines et elle ne contient qu'un faible pourcentage de masse de fibres. Elle a une faible teneur en cystine et en soufre par rapport à la fibre entière, et des quantités relativement importantes d'acides aminés, acides et basiques.

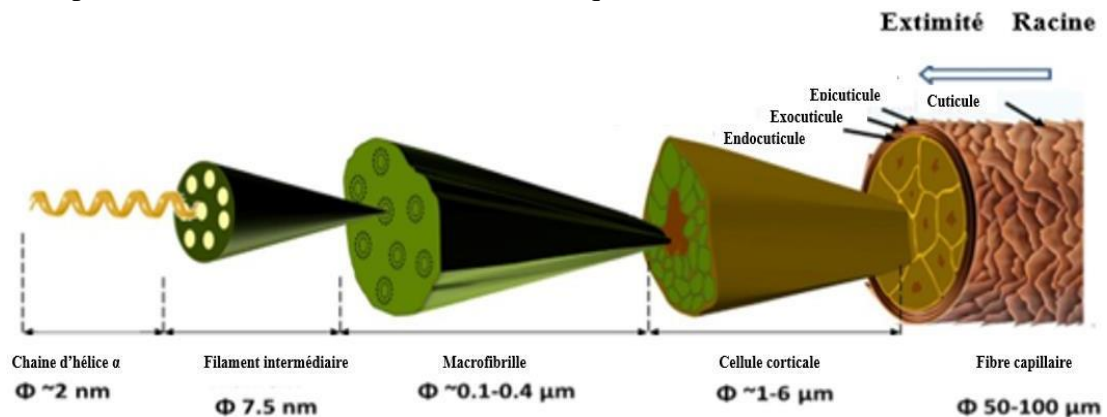


Figure. II.6 : Structure hiérarchique de la fibre capillaire humaine [15]

II.6.2. Kératine de la laine

La structure de la fibre de la laine est extrêmement complexe et contient environ 82% de protéines kératiniques riches en cystéine, et environ 17% de protéines non kératiniques pauvres en cystéine situées dans la membrane cellulaire et environ 1% de matière non protéique constituée de lipides cireux et d'une petite quantité de polysaccharides. Elle est de 20 à 80 μm de diamètre et d'une longueur pouvant aller jusqu'à 20 cm. L'analyse élémentaire montre que la laine non traitée se compose de : C : 44.72, H : 7.69, N : 14.89, S : 3.49. [16]

II.6.3. Kératine des plumes

Les kératines de plumes sont formées de la structure β -kératine qui est des polypeptides d'approximativement 100 acides aminés avec un poids moléculaires variant de 10 à 30 kDa, et quelques structures en hélice α . Il a été constaté qu'une petite quantité d' α -kératine contribue au développement de la plume. Les β -kératines des oiseaux ont une chaîne d'acides aminés plus courte que celle des autres kératines trouvées chez les mammifères. Par ailleurs, une étude montre que la plume comporte 9,38% d'hélice α , 47,19% de feuille β , 32,25% de β -tour et 11,18% au hasard. [15] [9] La kératine des plumes diffère également de la kératine de la laine dans la teneur en cystéine ; où les plumes contiennent environ 7% et la laine contient 11 à 17%.

Le **Tableau. II.4.** Résume la composition en acides aminés des kératines des cheveux humains, des plumes, et de la laine.

Tableau. II.4 : Comparaison de la composition en acides aminés entre les kératines des cheveux humains, des plumes, et de la laine.

Acides aminés	Laine	Cheveux humains	Plumes
Acide aspartique	6.4-7.0	7.09-9.3	5.42-6.7
Acide glutamique	11.3-13.4	11.56-16.6	6.9-9.7
Lysine	2.85-3.4	2.62-3.5	0.6-1.8
Arginine	3.3-7.1	3.19-7.2	1.7-4.96
Histidine	0.8-0.9	0.7-1.1	0.2-0.5
Serine	9.50-10.9	9.0-11.66	7.2-14.1
Thréonine	5.8-6.4	5.5-19.64	0.8-4.1
Tyrosine	1.96-4.1	1.2-2.5	4.6-4.15
Cystéine	5.7-11.4	7.6-12.92	5.07-7.8
Méthionine	0.4-0.59	0.4-2.49	0.1-0.41
Leucine	6.8-8.1	1.2-8.01	6.16-8.3
Valine	5.80-6.4	6.18-6.86	2.0-7.8
Phénylalanine	2.1-2.9	1.91-2.22	3.1-4.3
Glycine	8.0-9.4	5.2-6.56	7.16-16.2
Alanine	5.2-5.81	4.70-6.9	3.13-8.7
Proline	6.0-7.1	3.8-9.55	9.8-18.8
Isoleucine	3.1-3.5	3.12-3.7	3.2-4.3

II.6.4. Kératine des cornes, sabots, ongles et bec [17]

La corne est un tissu animal dur et qui se compose principalement de : kératine, des acides aminés libres, des peptides, des lipides, et des restes de microéléments (ça, Al, Cr, Cu, Fe, Mn et Zn). La protéine de kératine dans la corne animale est la fibre dure, et son traitement est très difficile.

- La kératine des sabots contient une conformation hélicoïdale α avec un mélange de feuille β et possède une stabilité thermique élevée.
- L'ongle humain est un tissu important du corps humain et composé principalement d'un réseau de kératine réticulé, une scléroprotéine contenant de grandes quantités de soufre (3,8%) avec plusieurs liaisons disulfures. Cette structure unique se traduit par une barrière de perméabilité très efficace.
- Le bec des oiseaux a une coquille externe de kératine dure qui se compose presque totalement en protéines.

II.7.1. Propriétés physico-chimiques

II.7.1.a. Masse moléculaire

La séparation et la comparaison entre la kératine humaine et bovine en utilisant l'électrophorèse sur gel bidimensionnelle ainsi que l'immuno- transfert montre que la masse moléculaire des kératines chez les mammifères varie de 40 à 70 kDa [10].

II.7.1.b. Point isoélectrique

Les kératines peuvent être distinguées en fonction de leur point isoélectrique. La distinction entre les kératines dites du type I (acide ou sous-famille A) et celles dites du type II (basique ou sous-famille B), est basée sur le pH auquel les protéines sont neutres. Ce dernier correspond au point isoélectrique. Le pI des kératines peut être changé en raison de la modification post- traductionnelle de leurs acides aminés.

Exemples :

- ✓ Chez l'homme, les kératines de type I ont un pI de 4,9 à 5,4 tandis que les kératines de type II ont un pI de 6,5 à 8,5.
- ✓ Chez les bovins, les kératines de type I ont un pI < 5,6 et les kératines de type II ont un pI > 6,0.
- ✓ La kératine des cheveux, les ongles et de la laine à un pI de 4.7 à 5.4.

II.7.1.c. Comportement vis-à-vis à l'humidité [18]

Les fibres de la kératine sont hygroscopiques, néanmoins elles présentent un caractère hydrophobe prononcé en surface. Ce comportement est important pour l'utilisation de la laine au niveau de l'habillement, due au fait que l'intérieur de la fibre adsorbe la vapeur d'eau, alors que l'eau liquide est repoussée par la surface extérieure hydrophobe de la cuticule.

II.7.1.d. Dégradation de la kératine [9] [19]**✓ Le traitement par les acides minéraux**

L'hydrolyse acide fournit des conditions très sévères qui peuvent détruire certains acides aminés utiles. Combiner un traitement acide à la température d'ébullition pendant environ 2-3 h pourrait ouvrir les ponts disulfures de la kératine et former des polypeptides hydrosolubles et des oligopeptides ou parfois quelques acides aminés libres. L'inconvénient de ce processus est la dégradation des acides aminés et des chaînes polypeptidiques à haute température qui affecte les valeurs d'amélioration nutritionnelle.

✓ Le traitement par les alcalins

Les kératines se dissolvent dans les alcalins à des pH d'environ 10 à 11 ou plus élevé, et cette dissolution se fait assez rapidement à des températures élevées. La kératine des plumes d'oiseau peut être obtenue par hydrolyse alcalin. Au cours de ce processus, des produits chimiques comme le sulfure d'ammonium ou le sulfure de sodium peuvent réduire le groupe disulfure en groupe thiol. Aussi, en utilisant du β -mercaptoéthanol, les groupes SH libres peuvent être partiellement modifiés. Le processus a été effectué pendant 90 min à 45–80 °C. Le poids moléculaire de la kératine obtenu était approximativement entre 1 kDa et 11 kDa. Pour la production de la kératine à partir des plumes de poulet, l'utilisation de 2-mercaptoéthanol et le bisulfite de sodium donne environ 84% et 82% de kératine, toutefois l'utilisation de l'hydroxyde de sodium (2,5%) a amélioré la production de la kératine jusqu'à 94%.

✓ Le traitement hydrothermique

Le traitement hydrothermique dépend d'une pression de vapeur élevée de 10 à 15 psi avec ou sans température élevée (80-140 °C) en présence des solutions acides (acide chlorhydrique, acide sulfurique et autres acides) ou des solutions alcalines (hydroxyde de sodium, hydroxyde de potassium, carbonate de sodium et autres).

II.7.2. Propriétés mécaniques [8]

II.7.2.1. Viscoélasticité

La viscosité représente la résistance d'un fluide à l'écoulement, elle est mesurée par le rapport de la contrainte de cisaillement au gradient de vitesse. La viscoélasticité est d'une importance primordiale pour les tissus kératiniques car elle fournit un support mécanique, absorbe l'énergie et amortit les fluctuations de charge. Généralement, avec l'augmentation du taux de déformation, les tissus kératiniques deviennent plus rigides et plus forts avec une contrainte de rupture décroissante.

II.7.2.2. Sensibilité à l'hydratation

Les propriétés mécaniques des kératines sont fortement influencées par la teneur en eau. Quand l'humidité augmente, la rigidité et la résistance diminuent alors que la contrainte de la rupture augmente. La diffraction des rayons X et les études expérimentales ont révélé que les protéines de la matrice pourraient être considérées comme sensible à l'eau, alors que les FI sont cristallins et ne sont pas affectés mécaniquement. Cela peut être appliqué aux matières kératiniques car les FI sont identiques dans toutes les kératines dures des mammifères.

II.7.3. Propriétés électriques

La kératine est un matériau isolant qui piège facilement l'électricité statique. Elle a une tendance à développer de la charge statique une fois frottée avec différents matériaux, la peau humaine, le plastique, etc. [18]

II.7.3.1. Biodégradation et gestion des déchets de kératine

La kératine est un polymère organique biodégradable où la biodégradation est liée à de fortes liaisons covalentes et à sa réticulation prolongée au sein de sa structure causant ainsi un problème de gestion des déchets. [20, 21] Chaque année plus de 65 millions de tonnes de déchets kératiniques sont mis en décharge ce qui est dangereux pour l'environnement. [22] Plusieurs systèmes de traitement thermique, chimique et biologique de ces déchets ont été utilisés y compris l'incinération, l'hydrolyse acide ou alcalin et thermo-hydrolyse. Néanmoins l'utilisation de ces systèmes n'est pas efficace. Cela est dû aux inconvénients suivants :

- L'incinération consomme de l'énergie et génère une grande quantité de dioxyde de carbone.
- Le traitement thermique alcalin détruit certains acides aminés essentiels.

La biodégradation par les microorganismes présente plusieurs avantages, c'est un procédé sûr, rentable et diminue la production de dioxyde de carbone. Malheureusement, l'emploi des mésophiles permet la propagation de nombreux agents pathogènes humains et animaux, y compris les champignons kératolytiques qui provoquent des maladies de la peau. D'autre part, l'utilisation de thermophiles et d'hyperthermophiles à une température élevée est plus sûre contre les agents pathogènes et les microorganismes producteurs de toxines.

II.8 Extraction de la kératine

Plusieurs travaux ont été faits sur l'extraction de kératine à partir de la laine, les plumes, ou les cheveux. Pour extraire la kératine de laine il faut donc appliquer une transformation chimique de celle-ci. Cette transformation a pour but de modifier la structure de la laine et consiste à casser les liaisons intramoléculaires à l'origine de cette stabilité, à savoir les ponts disulfures et les liaisons de moindre énergie comme les liaisons hydrogènes ou de Van der Waals, sans toucher aux liaisons peptidiques.

II.8.1 Réduction de la laine

Les agents réducteurs les plus fréquemment utilisés pour réduire les ponts disulfures de la kératine sont les thiols. Parmi eux on trouve principalement l'acide thioglycolique et le Mercaptoéthanol. (Figure. II.7)

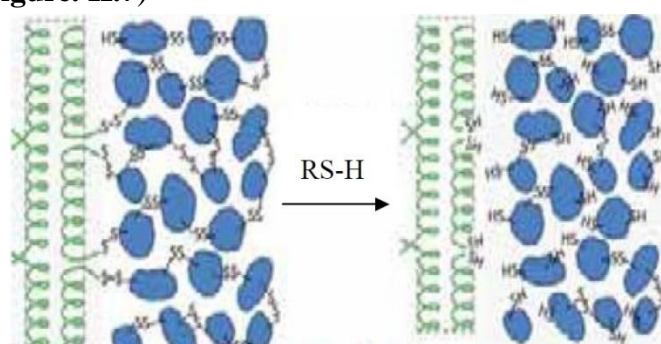
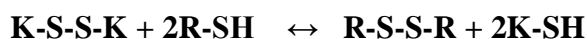


Figure. II.7: Réduction de la laine [23]

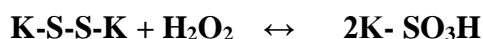
L'action de ces agents conduit à la formation de deux groupements sulfhydryles. [23]



Cette réaction est réversible, pour éviter la reformation des ponts disulfures par oxydation à l'air, la plupart des auteurs préconise l'alkylation des groupements sulfhydryles par un composé organohalogénéité, généralement l'acide iodoacétique. [24]

II.8.2 Oxydation de la laine

Oxydation de la laine existe deux classes d'agents oxydants pour la kératine, ceux qui sont capables de casser la totalité des ponts disulfures comme les peracides, l'eau oxygénée, l'acide hypochloreux et les chlorures. L'oxydation des ponts disulfures par tous ces agents conduit à la formation de l'acide cystéique par un mécanisme irréversible. [24] L'eau oxygénée H_2O_2 est un agent oxydant qui permet de rompre une grande partie des ponts disulfures de la laine. (Figure. II.8) La solution obtenue ne présente pas de fraction à haut poids moléculaire, ce qui signifie que les liaisons peptidiques sont largement endommagées.



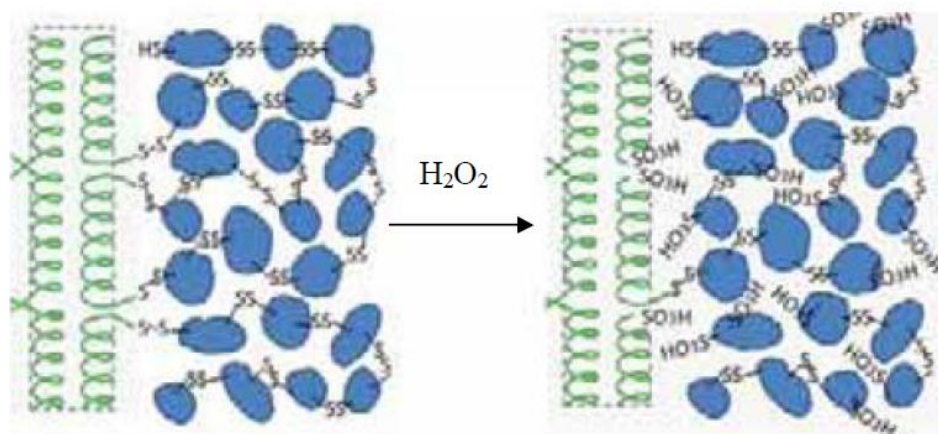


Figure. II.8: Oxydation de la laine [23]

II.8.3 Hydrolyse de la laine par un traitement alcalin

L'hydrolyse alcaline, comme toute méthode d'hydrolyse, conduit à la rupture de toutes les liaisons peptidiques d'une protéine si la base est forte. L'extraction de la kératine par plusieurs chercheurs se fait par des bases de NaOH à faible concentration (0,5 N). Cette solution permet la rupture des ponts de cystines. [25] Jeannette M ont extrait la kératine sous l'action des substances alcalines comme l'hydrolyse par NaOH, et par réduction en utilisant le mercaptoéthanol, la kératine obtenue sous forme gélatine qui contient des microfibrilles et la matrice. La cuticule est par contre détruite. Ils ont obtenu les résultats reportés dans le **tableau.II.5**

Tableau. II.5: La comparaison entre l'extraction de kératine par réduction et hydrolyse alcaline

	Hélice α	Feuillet β	Partie amorphe
Laine brute	58.2%,	37.9%	3.9%
Kératine obtenue par réduction	36.7%	50.2%	13.1%
Kératine obtenue par hydrolyse alcaline	25.7%	51.8%	22.5%

II.9. Applications industrielles de la kératine

La kératine des plumes est une source potentielle de biomatériaux abondants, peu coûteux, respectueux à l'environnement et commerciaux, elle est d'une importance incontournable dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique, biotechnologique, médicale, ...etc. [26]

II.9. 1. L'industrie cosmétique

La kératine est devenue quasi incontournable dans l'industrie cosmétique, elle rentre dans la production de divers produits tels que les crèmes et les shampoings. Ainsi leur existence dans la cuticule des cheveux et la couche cornée aide à préserver l'hydratation de la peau tout en interagissant avec les cosmétiques. [26] Plusieurs applications ont été décrites au fil du temps citant :

- La kératine hydrolysée et la kératine capillaire hydrolysée ont été utilisées pour le traitement des cheveux. Jusqu'à 0,2% de kératine a été rapportée dans le mascara, alors que la quantité est $\approx 0,028\%$ dans les savons de bain et détergents.
- Capacité de rétention d'eau, hydratation et élasticité de la peau s'est améliorée avec l'application de la kératine. [27]
- La kératine à haut poids moléculaire est principalement utilisée pour les soins de la peau en raison de son individualité comme filmogène et hydrophile.
- Film de kératine où le revêtement sur la peau procure une sensation douce. [26]
- Des protéines associées à la kératine à partir de différentes sources ont été développées et appliquées en tant que micro-échafaudages en cosmétique. [28]
- L'hydrolysate de kératine affecte l'hydratation de la peau, il peut agir à la fois comme humectant et occlusifs (réduisant la perte d'eau trans-épidermique).
- L'hydrolysate de kératine figure dans les shampooings et après-shampooings, lotions et sérums nutritifs pour les cheveux, ainsi que les mascaras, vernis à ongles et agents de maquillage pour les yeux. Leurs effets sont de former un film protecteur, lissage de la structure des cheveux ou des ongles, réguler la consistance des produits et favoriser la formation de mousse.
- L'hydrolysate de kératine réduit la tension superficielle, cependant ajouté en cosmétique permet de réduire la quantité d'émulsifiant ajoutée pour stabiliser les crèmes.
- L'hydrolysate de kératine limite les effets d'irritation déclenchés par les agents nettoyants (tensioactifs) sur la peau, les yeux et les cheveux.
- Le haut pouvoir tampon d'hydrolysate de kératine est exploité pour stabiliser le pH des cosmétiques. [29]

II.9. 2. L'industrie pharmaceutique

Due à la préoccupation environnementale croissante, les matériaux biosourcés tels que la kératine peuvent remplacer les produits pétrochimiques pour des applications pharmaceutiques [30]. Les nanoparticules de la kératine, ainsi que les hydrogels, films et éponges à base de kératine ont été proposées comme un système d'administration des médicaments anti-inflammatoires, antitumoraux ou antibiotiques. [31]

II.9. 3. Nanoparticules de la kératine

II.9. 3. 1. Administration des médicaments

En raison de leurs grandes surfaces, les nanoparticules sont préférées à l'association et la libération de divers produits pharmaceutiques pour divers avantages tels que : Cibler précisément le site de livraison, prolonger et contrôler la libération. [32] Le développement de nanoparticules de kératine-g-polyéthylène glycol chargées de la doxorubicine (DOX) a indiqué que l'efficacité de chargement augmente avec l'augmentation de la teneur en kératine dans les nanoparticules de kératine-g-PEG, ceci est dû à la formation des liaisons hydrogènes entre la kératine et le médicament. Ainsi la libération du médicament a été étudiée à différentes concentrations de Glutathion (GSH) correspondant à celles présentes dans les cellules et le plasma sanguin. La présence de trypsine et une concentration plus élevée en GSH a déclenché la libération du DOX chargée dans les nanoparticules. Étant donné que les

nanoparticules de kératine-g-PEG ne présentent aucune cytotoxicité pour les cellules MCF-7, elles pourraient avoir des applications en tant que porteur de médicament pour le traitement du cancer. [15] Les nanoparticules de la kératine pourraient se dégrader efficacement dans le corps. Due à leur biocompatibilité et leur grande disponibilité, elles sont favorisées pour l'administration des médicaments par rapport aux polymères synthétiques et aux glucides. Elles pourraient être des véhicules d'administration des médicaments efficaces ciblant les reins et le foie pour une libération prolongée, et potentiels face à des maladies du bétail. Ainsi enduire les nanoparticules d'argent par les nanoparticules de la kératine permet d'améliorer leur stabilité dans l'eau. [32]

II.9. 3. 2. Les activités anti-cancéreuses et antioxydantes

Les nanoparticules de la kératine sont dotées d'une activité anticancéreuse. Une étude sur ses capacités d'agir comme un système d'administration pour la thérapie photo dynamique du cancer a montré que les nanoparticules chargées de la kératine ont révélé une excellente capacité à traverser les cellules tumorales et entraîne une mort cellulaire plus importante (90%) par rapport au chlore e6 libre. [33] Dans une autre étude, les microparticules de la kératine montrent qu'elles sont aussi de puissants anticancéreux contre : HeLa (cervicale) et SK-OV-3 (ovaire). Cependant, une efficacité antioxydante très significative a été observée pour les microparticules de kératine traduisant de fortes activités à piéger des radicaux libres envers la DPPH et ABTS. [30]

II.9. 4.L'hydrogel de kératine

L'hydrogel à base de kératine est entièrement biocompatible et favorise la libération lente des antibiotiques fournissant ainsi une activité antimicrobienne soutenue sans gêner la réparation des plaies dans le traitement des brûlures et lutte contre les infections. Un exemple illustrant cette capacité est l'hydrogel de kératine chargé de ciprofloxacine qui a réduit de manière significative la quantité de *P. aeruginosa* et *S. aureus* dans la brûlure de > 99% (4, 7, 11 et 15 jours) après la blessure comparée au traitement à la sulfadiazine d'argent. [35]

II.9.5. L'hydrolysate de kératine

Des études récentes ont montré que les kératines contiennent des séquences d'acides aminés avec des activités biologiques élevées telles que les activités antioxydantes, antimicrobiennes, enzyme de conversion de l'angiotensine I, inhibitrices de la dipeptidyl peptidase IV. [36] Une forte activité antioxydante a été enregistrée par l'hydrolysate enzymatique d'un mélange de corne et de sabot et de plume de poulet ainsi qu'une activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) dans des hydrolysats de kératine des plumes de volailles. [36]

II.9. 5.1. Pansement hémostatique

Une étude animale sur l'application d'hydrogel de kératine comme un pansement pour les plaies sur une souris avec un foie artificiellement blessé a montré une perte de sang plus faible, et un maintien d'une pression artérielle moyenne stable ce qui a démontré l'utilisation potentielle d'hydrogels de kératine comme agent hémostatique. [27]

II.9. 5.2. Régénération nerveuse

Plusieurs études in vitro ont montré que l'hydrogel à base de kératine des cheveux humains peut être utilisé pour induire une régénération nerveuse efficace. [37]

II.9. 6. Films de kératine

Des études ont montré les diverses applications des films à base de kératine. [6] Ils sont plus favorables à la prolifération cellulaire par rapport au verre et au collagène, néanmoins les films de kératine purs sont trop fragiles pour une utilisation pratique. Cependant, l'addition de glycérol a donné un film transparent, relativement solide, flexible et biodégradable. Des molécules bioactives telles que les phosphatases alcalines sont associées à des films de kératine pour des applications à libération contrôlée. Les films de kératine-Fibroïne de soie ont montré des propriétés d'antithrombogénicité améliorées et une biocompatibilité accrue en comparaison avec les films de fibroïne de soie ou de kératine seules. [6] De plus, les films de kératine ont montré une meilleure transmission de la lumière et une meilleure résistance biomécanique par rapport à la membrane amniotique humaine, ce qui rend ces derniers un alternatif prometteur pour la reconstruction de la surface oculaire. [38]

II.9. 7. Traitement du cuir et du textile

- L'hydrolysate de kératine a été utilisé dans le traitement du cuir, en particulier pendant les opérations de tannage du chrome pour améliorer l'absorption du sel de chrome par le cuir. [35]
- L'utilisation de l'hydrolysate de kératine issu des plumes de poulet et des cheveux humains dans le processus de ! influence l'effet lubrifiant qui améliore la douceur des grains caractéristiques des cuirs. [39]
- Fils filés à la main peuvent être fabriqué en mélangeant des fibres de plumes (barbes) avec du coton.
- Les plumes peuvent servir d'agent d'encollage pour les fils textiles. Cependant elles aident à améliorer la résistance à la traction et la résistance à l'abrasion des fils. [35][39]
- Les plumes peuvent être de bonnes alternatives de polyvinyle pour le calibrage des textiles. [39]

II.9. 8. Kératine comme engrais

Une solution d'acides aminés liés au soufre tiré de la kératine est utilisée pour préparer un engrais organique qui améliore le métabolisme des plantes. La kératine représente une bonne source d'azote. Néanmoins, l'utilisation des plumes de poulet comme un biofertilisant est limitée à cause des liaisons cystéines qui les rendent difficiles à dégrader. [26] Cependant des traitements avec des microorganismes ont été utilisés afin d'augmenter l'utilité des déchets de plumes comme un biofertilisant.

⊕ Autres applications de la kératine. [26] [39]

⊕ Les matières kératiniques sont utilisées comme additifs dans la préparation du béton et de la céramique.

- ⊕ L'hydrolysate de kératine issu des plumes est utilisé comme un complément alimentaire pour la nourriture des ruminants en raison de sa composition similaire avec la protéine de soja.
- ⊕ La modification enzymatique par enrichissement en lysine conduit à une augmentation de la valeur nutritive des aliments. [40]
- ⊕ L'oxydation des matières kératiniques clive et oxyde certaines liaisons disulfures pour former des peptides hydrosolubles et cette matière est utilisée comme agent de cicatrisation des plaies. [41]
- ⊕ La composition anti-incendie est préparée à partir d'une solution de colloïde organique dérivée de l'hydrolysate des cornes et des sabots.
- ⊕ La présence d'une grande quantité d'azote dans les plumes lui rend un matériau utile comme retardateur de flamme. Ainsi une haute ignifugation a été transmise aux tissus après un traitement par le retardateur de flamme à base de plumes. [42]

II.10. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté la structure de la kératine, les propriétés physicochimiques, en exposant les déchets kératiniques comme la laine, les cheveux et les plumes. D'après cette étude bibliographique, nous constatons que la différence entre toutes ces fibres réside dans leur composition en acides aminés mais leurs structures et leurs comportements sont très similaires à celles de la laine. Ensuite, nous avons décrit brièvement les méthodes d'extraction de la kératine.

Références bibliographiques

- [1] E. Renuart, C. Viney. Biological fibrous materials: Self assembled structures and optimised properties. Pergamon Materials Series. M. Elices (Eds). Elsevier. **2000**. 4 :223-267.
- [2] A. Shavandi, Tiago H. Silva, Adnan A Bekhit, A. Bekhit. Dissolution, Extraction and Biomedical Application of Keratin. Biomaterials Science. **2017**. 5(9): 1699-1735.
- [3] M. Rajabi, Mohammad A. Ali, M. McConnell, J. Cabral. Keratinous materials : Structures and functions in biomedical applications. Materials Science and Engineering : C. **2020**. 110 :1-22.
- [4] P. Mathur, Javed N. Sheikh, K. Sen. Durable flame-retardant wool using sulphamic acid. Polymer Degradation and Stability. **2020**. 174 :1-9.
- [5] Tarun K. Kumawat, V. Sharma, A. Sharma, S. Chandra. Keratin Waste: The Biodegradable Polymers. Intechopen. **2018**. 150-169.
- [6] L. Khtaoui. Etude de la protection thermique et UV des cellules photovoltaïques par un dépôt des fibres kératiniques afin d'améliorer leurs rendements. Université mouloud Mammeri, Tizi-ouzou. **2012**.
- [7] A. Shah, S. Tyagi, Ram N. Bharagava, D. Belhaj, A. Kumar, G. Saxena, Ganesh D. Saratale, Sikandar I. Mulla. Keratin Production and Its Applications: Current and Future Perspective. Keratin as a Protein Biopolymer: Extraction from Waste Biomass and Applications. S. Sharma, A. Kumar (Eds). Springer. **2019**. 19-34
- [8] W. Kanoksilapatham, W. Intagun. A Review : Biodegradation and Applications of Keratin Degrading Microorganisms and Keratinolytic Enzymes, Focusing on Thermophiles and Thermostable Serine Proteases. American Journal of Applied Sciences. **2017**. 14(11) :1016-1023.
- [9] Basma Y. Alashwal, Mohamed S. Bala, A. Gupta, S. Sharma, P. Mishra. Improved properties of keratin-based bioplastic film blended with microcrystalline cellulose: A comparative analysis. Journal of King Saud University – Science. **2020**. 32(1):853-857.
- [10] L. Guoa, L. Lu, M. Yin, R. Yang, Z. Zhang, W. Zhaoa, Valorization of refractory keratinous waste using a new and sustainable bio-catalysis, Chemical Engineering Journal. **2020**. 397:1-11.
- [11] S. Sharma, A. Gupta. Sustainable Management of Keratin Waste Biomass: Applications and Future Perspectives. Brazilian Archives of biology and technology. **2016**. 59 :1-14.
- [12] N. Reddy. Miscellaneous Applications. Keratin-based Biomaterials and Bioproducts. N. Reddy (Eds). Smithers. **2017**. 153-167.
- [13] A. Lipkowski, B. Gajkowska, A. Grabowska, K. Kurzepa. Keratin-associated protein micromaterials for medical and cosmetic applications. Polimery. **2009**. 54(5) :386-388.
- [14] P. Mokrejs, J. Pavlackova, M. Hutta, P. Egner, The cosmetic and dermatological potential of keratin hydrolysate. Journal of Cosmetic Dermatology. **2017**. 16(14) :1-7.
- [15] S. Sharma, A. Gupta, Syed M. Saufi. Gek K. Chua, Doo H. Kim, B. Mistry. G. Sharma. Characterization of keratin microparticles from feather biomass with potent antioxidant and anticancer activities. International Journal of Biological Macromolecules. **2017**. 104(Pt A) :189- 196.

- [16] T. Posati, D. Giuri, M. Nocchetti, A. Sagnella, M. Gariboldi, C. Ferroni, G. Sotgiu, G. Varchi, R. Zamboni, A. Aluigi. Keratin-hydroxycalcium hybrid films for drug delivery applications. *European Polymer Journal*. **2018**. 105 :177-185.
- [17] N. Reddy. Keratin Micro/Nanoparticles. *Keratin-based Biomaterials and Bioproducts*. N. Reddy (Eds). Smithers. **2017**. 139-152.
- [18] H. Xu, Z. Shi, N. Reddy, Y. Yang. Intrinsically Water-Stable Keratin Nanoparticles and Their in Vivo Biodistribution for Targeted Delivery. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **2014**. 62(37) :9145–9150.
- [19] A. Aluigi, G. Sotgiu, C. Ferroni, S. Duchi, E. Lucarelli, C. Martini, T. Posati, A. Guerrini, M. Ballestri, F. Corticelli. Chlorin e6 keratin nanoparticles for photodynamic anticancer therapy. *RSC Advances*. **2016**. 6 (40) :33910–33918.
- [20] Daniel C. Roy, S. Tomblyn, Kameel M. Isaac, Christine J. Kowalczewski, David M. Burmeister, Luke R. Burnett, Robert J. Christy. Ciprofloxacin-loaded keratin hydrogels reduce infection and support healing in a porcine partial-thickness thermal burn. *Wound Repair and Regeneration*. **2016**. 24(4) :657-668.
- [21] I. Sinkiewicz, H. Staroszczyk, A. Sliwinska. Solubilization of keratins and functional properties of their isolates and hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*. **2018**. 42(2) :1- 11.
- [22] H. Lee, K. Noh, Sang C. Lee, Il K. Kwon, Dong W. Han, In S. Lee, Yu S. Hwang. Human Hair Keratin and Its-Based Biomaterials for Biomedical Applications. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. **2014**. 11(4):255-265.
- [23] Maria Antoaneta Baias. Science and History Explored by Nuclear Magnetic Resonance. These de Doctorat, université de berichter, **2009**. P 27.
- [24] Christophe J. Etude de la valorisation des déchets d'origines kératiniques par voie thermo-mécano-chimique en vue de l'obtention de filament continu : cas spécifique de la laine. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse. **2003**. P 15-30,184, 198.
- [25] Jeanette M. Cardamone, Alberto N, Rafael A. Garcia, and Mila Aldema-Ramos Characterizing Wool Keratin » Fats, Oils, and Animal Coproducts Research Unit, Wool
- [26] Research, USDA ARS Eastern Regional Research Center, USDA ARS, **2009**.
- [27] S. Reichl, M. Borrelli, G. Geerling. Keratin films for ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. **2011**. 32(13) :3375-3386.
- [28] R. Karthikeyan, B. Srinivasan, P K. Sehgal. Industrial applications of keratins – A review. *Journal of Scientific & Industrial Research*. **2007**. 66(9) :710-715.
- [29] Hafiz M. N. Iqbal, T. Keshavarz. Keratin-Based Materials in Biotechnology. *Handbook of Composites from Renewable Materials*. Vijay K. Thakur, Manju K. Thakur, Michael R. Kessler (Eds). Wiley. **2017**.1:271–288.
- [30] S. Sharma, A. Gupta, A. Kumar. Keratin: an introduction. *Keratin as a Protein Biopolymer : Extraction from Waste Biomass and Applications*. S. Sharma, A. Kumar (Eds). Springer. **2019**. 1-18.
- [31] Hermann H. Bragulla, Dominique G. Homberger. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy*. **2009**.214(4) : 516-559.

- [32] S. Feroz, N. Muhammad, J. Ratnayake, Gdias. Keratin - Based materials for biomedical applications. *Bioactive Materials*. **2020**. 5(3) :496-509.
- [33] T. Kornilowicz-Kowalska, J. Bohacz. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Management*.**2011**.31(8) :1689-1701.
- [34] E. Renuart, C. Viney. Biological fibrous materials: Self assembled structures and optimised properties. *Pergamon Materials Series*. M. Elices (Eds). Elsevier.**2000**. 4 :223-267.
- [35] A. Shavandi, Tiago H. Silva, Adnan A Bekhit, A. Bekhit. Dissolution, Extraction and Biomedical Application of Keratin. *Biomaterials Science*. **2017**.5(9) : 1699-1735.
- [36] M. Rajabi, Mohammad A. Ali, M. McConnell, J. Cabral. Keratinous materials: Structures and functions in biomedical applications. *Materials Science and Engineering : C*. **2020**.110:1-22.
- [37] P. Mathur, Javed N. Sheikh, K. Sen. Durable flame-retardant wool using sulphamic acid. *Polymer Degradation and Stability*.**2020**. 174 :1-9.
- [38] Tarun K. Kumawat, V. Sharma, A.Sharma, S. Chandra. Keratin Waste : The Biodegradable Polymers. *Intechopen*.**2018**.150-169.
- [39] L. Khtaoui. Étude de la protection thermique et UV des cellules photovoltaïques par un dépôt des fibres kératiniques afin d'améliorer leurs rendements. Université mouloud Mammeri, Tizi-ouzou.**2012**.
- [40] A. Shah, S. Tyagi, Ram N. Bharagava, D. Belhaj, A. Kumar, G. Saxena, Ganesh D. Saratale, Sikandar I. Mulla. Keratin Production and Its Applications: Current and Future Perspective. *Keratin as a Protein Biopolymer: Extraction from Waste Biomass and Applications*. S. Sharma, A. Kumar (Eds). Springer.**2019**. 19-34
- [41] W. Kanoksilapatham, W. Intagun. A Review : Biodegradation and Applications of Keratin Degrading Microorganisms and Keratinolytic Enzymes, Focusing on Thermophiles and Thermostable Serine Proteases. *American Journal of Applied Sciences*.**2017**. 14(11) :1016-1023.
- [42] Saïd Berrada. Les principaux produits capillaires composition et propriétés. *Académie de Montpellier*.**2007**. p3.

Partie

Pratique

Chapitre III

*Procédures
expérimentales*

de

l'extraction

et

la caractérisation

III.1. Introduction

La partie expérimentale a pour but de produire et de caractériser le chitosane à partir des déchets de carapaces de crevettes et la kératine des plumes dans le cadre de valorisation des déchets des carapaces de crevettes rouge issues de pêcheries (et/ou bien des Restaurants) et des déchets plumes d'abattoir de la région de M'sila.



Carapaces de crevettes



Plumes Collectées



Laine du mouton

Le travail expérimental sera déroulé comme suit :

- ✓ Collecte des carapaces de crevettes rouge à partir de pêcheries et des plumes des abattoirs locaux.
- ✓ Traitement mécanique (lavage, séchage et broyage).
- ✓ Production de la farine des crevettes et des plumes.
- ✓ Extraction du chitosane et de la kératine en se basant sur des protocoles standardisés.
- ✓ Purification du chitosane de la kératine selon des techniques de référence.
- ✓ Caractérisation chimique et physique moyennent les analyses suivantes : FTIR, UV Visible.
- ✓ Dosages et les analyses physicochimiques et biochimiques du chitosane et la kératine.

III.1.1. Matériels et Produits

III 1.1.1. Matériel

Solutions et réactifs utilisées :

- Solution d'acide chlorhydrique (HCl), DP 37-38 %
- Solution de la soude (NaOH) concentrées, DP 97%
- Acide acétique, DP 99 %
- Chlorure de sodium NaCl, DP 99.5%
- L'acide acétique CH₃COOH à 99.8% en masse et de densité 1,05
- DMSO (Sulfoxyde de méthyle), anhydre, ≥99,9%
- H₂O₂ (Peroxyde d'hydrogène solution), 30 % (p/p) dans H₂O, contient un stabilisant
- Acétone, réactif ACS, ≥99,5 %

III.1.1.1.2. Verrerie de laboratoire

Fioles jaugées, agitateurs en verre, entonnoirs, béchers, pipettes, éprouvettes, flacons, erlenmeyers, entonnoir Büchner, capsules, boîtes de pétrie, burettes, tubes à essais. Papier filtre, Papier aluminium, barreaux magnétiques, spatules et micropipette.

II.1.2. Appareillages :

- Spectrophotomètre UV-Visible Medline MD-2100 UV.
- pH mètre de marque HANNA instrument (type : pH 211).
- Agitateur magnétique et plaque chauffante.
- Conductimètre de marque WTW type (1970I).
- Jar test de marque HANNA instrument (FP4 PORTABLE JAR TEST).
- Pompe de filtration sous vide.
- Étuve de marque MEMMERT.
- Thermomètre.

III.1.2. Méthodes

Partie A : Préparation et caractérisation du chitosane

III.1.2.1. L'extraction et caractérisation du chitosane

III.1.2.2.1. Procédé d'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevettes

Pour cette étude, la matière première utilisée est l'exosquelette de crevettes qui nous ont été fournies fraîches.

Prétraitement des carapaces

Une quantité des crevettes rouges ont été soigneusement décortiquées, lavées plusieurs fois avec l'eau de robinet afin d'éliminer toutes les impuretés possibles (sels, sables, coquilles, etc.), ensuite à l'eau distillée puis séchées sur des plateaux dans l'étuve à 40°C pendant 48h, et enfin broyées en fine poudre. [1,2] À la fin on va récupérer notre poudre. (Figure.III.1)



Figure.III.1 : Prétraitement des carapaces de crevettes

L'extraction de ce dernier est passée par quatre étapes : déminéralisation, déprotéinisation, décoloration, et à la fin la désacétylation. (Figure.III.2)

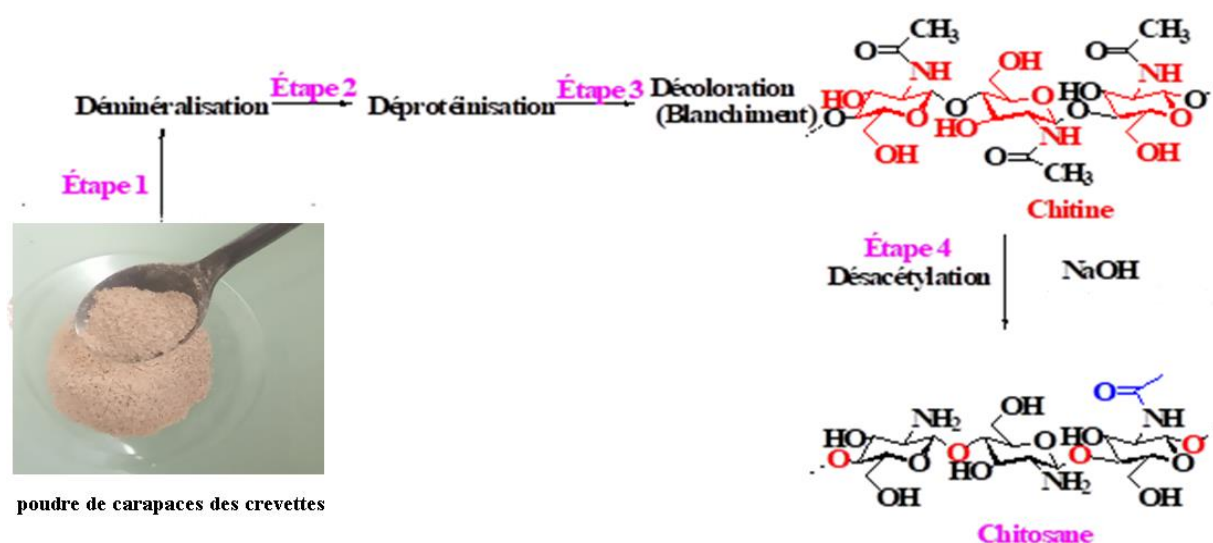


Figure.III.2. Les étapes d'extraction du chitosane

Chez les crustacés, la chitine est présente sous forme de mucopolysaccharides intimement associés au calcaire de la coquille, et liés par des liaisons covalentes aux protéines, aux caroténoïdes, aux lipides et aux pigments. Par conséquent, après le prétraitement, les carapaces de crevettes doivent subir une autre série des traitements qui se déroule en 4 étapes essentielles : une déminéralisation, une déprotéinisation, une étape de blanchiment et une étape de désacétylation. [1,2]

III.1.2.1.1.a. Déminéralisation :

Les carapaces, une fois prétraitées (lavage, séchage et broyage), ont été soigneusement immergées dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique HCl 2N avec un rapport de masse du solide/volume du liquide 1 :10 (w/v) et l'ensemble a été soumis à une agitation modérée pendant 2 jours à température ambiante afin de dissoudre les minéraux qui accompagnent les carapaces (Figure.III.3.). Le carbonate de calcium (CaCO_3), principal composé minéral de la carapace, réagit avec HCl pour former du chlorure de calcium, de l'eau et du gaz carbonique comme décrit dans la réaction suivante : $2 \text{HCl}_{(\text{aq})} + \text{CaCO}_{3(\text{s})} \rightarrow \text{CaCl}_{2(\text{aq})} + \text{H}_2\text{O}_{(\text{l})} + \text{CO}_{2(\text{g})}$

Après la déminéralisation, la solution a été filtrée et la matière obtenue a été lavée plusieurs fois à l'eau distillée jusqu'à la neutralité puis séchée à l'étuve pendant une nuit à une température de 50 °C.



Figure.III.3.: Déminéralisation des carapaces de crevettes par HCl 2N.

III.1.2.1.1.b. Déprotéinisation

Dans cette étape, les carapaces déminéralisées ont été soumises à un traitement alcalin par la soude 1N à 80 °C dans un bain marie pendant 6 heures avec des proportions solide/liquide 1:20 (w/v). Une filtration sous vide suivie d'un lavage à l'eau distillée ont été nécessaires jusqu'à neutralité, afin d'éliminer toutes les protéines qui ont été séparées de la chitine. La matière récupérée a été étuvée pendant une nuit à 40°C. (**Figure.III.4**)



Figure.III.4. : Étape de déprotéinisation des carapaces de crevette par NaOH 1N.

III.1.2.1.1.c. Blanchiment :

Le produit obtenu après déprotéinisation a été traité par le peroxyde de l'hydrogène H₂O₂ (0,315%) avec un rapport du solide au solvant 1 :10 (w/v), sous agitation magnétique qui a été maintenue durant 4 heures. Après ces trois étapes, la chitine obtenue a été rincée plusieurs fois à l'eau distillée puis séchée (**Figure.III.5**).

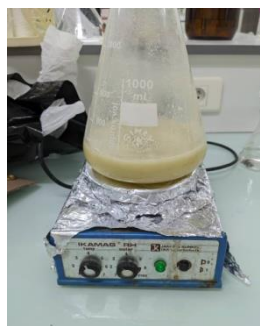


Figure.III.5 : Blanchiment des carapaces de crevette par l'eau oxygénée.

III.1.2.1.1.d. Préparation du chitosane « désacétylation » de la chitine :

C'est l'étape la plus délicate qui met en œuvre la substitution d'un nombre maximal et suffisant de groupements acétyles, pour aboutir au chitosane (**Figure.III.6**).

La désacétylation a été effectuée par un traitement avec l'hydroxyde de sodium (NaOH) à 45% et à température ambiante, pendant 35 jours avec un rapport solide au solvant 1:50 (w/v) [1]. Le produit ainsi obtenu a été filtré et lavé à l'eau distillée jusqu'à stabilisation du pH des eaux de lavage, puis étuvé à 50 °C jusqu'à séchage.

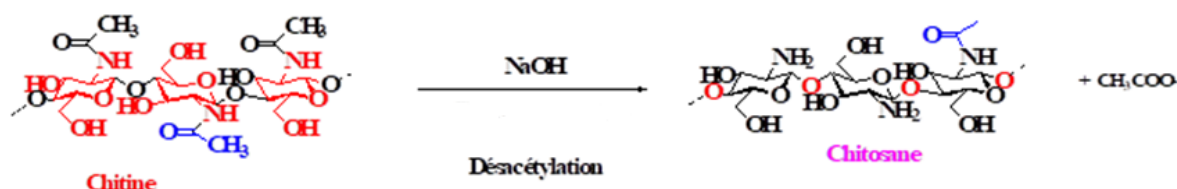


Figure.III.6 : Préparation du chitosane « désacétylation » de la chitine

Le chitosane obtenu est séché dans l'étuve à température égale à 90°C pendant une nuit. Puis broyé, pour avoir une poudre fine. Le chitosane ainsi séché est traité suivant la méthode suivante : 1% de chitosane est préparé dans de l'acide acétique 2%, agiter pendant une heure et laisser décanter jusqu'à formation de précipité. Les impuretés se présentent sous forme de précipité tandis que le chitosane pure est soluble dans l'acide acétique, qui est récupéré dans un autre bécher. Augmenter ensuite le pH de la solution à l'aide d'une solution de soude 0,1N jusqu'à obtention de pH égale à 8, pour récupérer le chitosane pur soluble dans l'acide acétique. La solution est ensuite lavée avec de l'eau distillée jusqu'à pH neutre et filtrée. Sécher dans l'étuve à température égale à 90°C pendant 3heures. Broyer et conserver la poudre de chitosane pur à température ambiante.

III.1.3. Caractérisation qualitative des produits

III.1.3.1. Teneur en eau

Pour estimer la part d'eau dans un produit, 1 à 2 g d'échantillon sont prélevés et pesés dans une coupelle de poids connu. La coupelle est placée 24 h dans une étuve à 105-110 °C, puis pesée après 30 min de refroidissement. L'expérience est réalisée en triplicata. La teneur en eau est évaluée selon la formule suivante :

$$\% \text{Humidité} = \frac{\text{Poids humide (g)} - \text{Poids de l'échantillon sec (g)}}{\text{Poids de l'échantillon humide (g)}} \times 100 \dots \dots \dots (1)[3]$$

III.1.3.2. Teneur en cendres

Le principe de la détermination de la teneur en minéraux repose sur leur résistance à la chaleur. Environ 1 g d'échantillon est pesé dans une feuille de papier en aluminium de poids connu. Elle est repliée et placée au moins 5 h à 500 °C. Après refroidissement, elle est de nouveau pesée. Chaque mesure est répétée trois fois. La teneur en cendres est évaluée selon la formule suivante :

$$\% \text{ cendres} = \frac{\text{Poids du résidu calciné (g)}}{\text{Poids de l'échantillon sec (g)}} \times 100 \dots \dots \dots (2)[3]$$

III.1.3.3. Test de solubilité

L'une des caractéristiques du chitosane par rapport à la chitine est sa solubilisation en milieu acide dilué, l'acide le plus fréquemment utilisé est l'acide acétique. [4] En effet, les groupements aminés (NH₂) du chitosane sont protonés à partir du pH 3 à 4 et le polymère chargé positivement (NH₃⁺) devient soluble. Grâce à cette propriété, il est possible de confirmer avec certitude que les produits préparés sont du chitosane. Dans cette étude, 50mg de chitines désacétylées ont été solubilisés dans 50 ml d'acide acétique à 1%.

● Mesure du degré d'acétylation

Le degré d'acétylation de la chitine correspond à la fraction molaire moyenne des unités de N acétyl D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités. De nombreuses méthodes ont été développées pour déterminer le DA.

● Dosage conductimétrique basique

Solubiliser 150mg de chitosane dans 10ml de HCl 0,1N et ramener le volume à 200ml avec de l'eau distillée. Titrer la solution par une solution de NaOH 0,1N. À chaque 0,5ml de volume versé, noter la conductivité. Le DD obtenu par dosage conductimétrique basique se calcule comme suit :

$$DD\% = \frac{2.03.(V_2 - V_1)}{m + 0.0042.(V_2 - V_1)} \dots \dots \dots (3) [3,4]$$

Où

DD : Représente le degré de désacétylation (%),

V₂ et V₁ : Les volumes de NaOH versé en ml

M : La masse du chitosane (g)

2.03 : Le coefficient résultant du poids moléculaire de l'unité de monomère de chitosane

0.0042 : Le coefficient résultant de la différence entre le poids moléculaire du monomère acétylé et la masse moléculaire désacétylé.

● Dosage conductimétrique acide

Disperser 150mg de chitosane dans 200mL d'eau distillée, titrer le mélange, tout en l'agitant avec une solution de HCl 0,1N jusqu'à dépasser le point de solubilisation complète du chitosane. Mesurer la conductivité de la solution après chaque ajout de HCl.

Le DD obtenu par dosage conductimétrique acide se calcule de la manière :

$$DD\% = \frac{2.03.V.N}{m + 0.0042.V.N} \dots \dots \dots (4)[3]$$

Avec

V : Volume de HCl versé en ml

N : Normalité du HCl en mol/L

III.1.3.4. Caractérisation par spectrophotométrie UV-visible

Une solution de chitosane de 1% a été préparée dans une solution d'acide acétique de 2%. Ensuite, un échantillon de cette solution a été balayé par un spectre UV-visible de 200-800 nm. Le trajet optique de la cellule utilisée est de 1 cm de marque "UV-1800, SHIMAZDU" été développés pour les mesures d'absorbance d'échantillon liquide. En parallèle, des systèmes hauts précision et haute énergie.

Partie B : Préparation et caractérisation de la kératine

Les matières d'origine kératinique sont, la laine, les plumes, les cheveux, les cornes etc...., en rappelant que tous ces déchets contiennent plus de 90% de kératine. L'étude bibliographique effectuée à cet effet a montré que la kératine est une protéine fibreuse très particulière et parmi les polymères semi cristallins, possédant de nombreux ponts disulfures qui lui confèrent sa stabilité et sa résistance aux agressions chimiques, elle présente un caractère hydrophile sans dissoudre dans l'eau

III.2. Préparation

III.2.1. Préparation de la farine de plume

Les plumes subissent plusieurs lavages à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée. Laisser sécher à l'air libre. Les plumes séchées subissent un deuxième séchage dans une étuve chauffé à 170 °C pendant 2h puis découpées en petits morceaux à l'aide d'un ciseau. Broyer à l'aide d'un broyeur et tamiser pour éliminer les grosses particules et à voir une farine homogène de diamètre 200 micro mètre.

III.2. 2. Préparation de la laine

Après lavage au détergent puis rinçage à l'eau en abondance, la laine est séchée à l'air libre. Les fibres de laine initialement de longueur 10 cm ont été coupées à de courtes fibres d'une longueur moyenne de 3 à 5 mm puis broyées pour obtenir une poudre fine de 1 mm

III.3. L'extraction

III.3.1. Extraction de la kératine à partir des plumes

Méthode 1 : On prend 2g des plumes déjà rincées, séchées et broyées et on les dissout dans 100ml de DMSO dans un erlenmeyer, on met le mélange sous agitation et chaleur de 80°C pendant 4h. Ensuite on fait la filtration et on ajoute au mélange 50ml de l'acétone et le met dans le congélateur (0 - 2°C). De temps en temps on vérifie la précipitation de la kératine dans notre mélange.

Le précipité est récupéré par filtration sous vide pendant 20min, puis lavé deux fois avec l'eau distillée et séché à 50°C jusqu'à l'obtention d'une poudre et ensuite conservée à une température ambiante jusqu'à l'analyse.

Méthode 2 : On prend 2g des plumes déjà rincées, séchées et broyées et on les ajoute une solution de NaOH 2% déjà préparée (2g de NaOH + 100ml de l'eau distillée) dans un erlenmeyer, on met le mélange sous agitation et à T= 60°C pendant 3-4h. Ensuite on filtre le

mélange et le met dans l'étuve pour évaporer l'excès de liquide, donc l'obtention de notre solution de kératine.

III. 3.2. Extraction de la kératine à partir de laine :

On prend 2g de laine déjà rincées, séchées et on l'ajoute 100mL de DMSO dans un bécher, on met le mélange sous agitation et chaleur de 80°C pendant 4h. En fin on fait une filtration sous vide pour l'obtention de notre solution de kératine, et elle est prête à être utilisée dans différentes formulations.

III.4. Caractérisation chimique et physique

III.4.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

IRTF est une technique qui permet de déterminer les composants chimiques du produit à analyser en identifiant la variété des groupes fonctionnels qu'il contient. Elle est applicable pour une large gamme de matériaux solide, liquide ou gazeux, et pourrait être utilisée pour une analyse qualitative et quantitative. IRTF repose sur le principe d'interférence de rayonnement entre deux faisceaux qui se traduit par un signal appelé interférogramme. Les groupes fonctionnels de la kératine ont été analysés par la Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). Les spectres IRTF sont réalisés, pour un nombre d'onde compris entre 500 à 4000 cm^{-1} avec une résolution ($R= 8$). Nous préparons le mélange de poudre à analyser en le broyant finement avec du KBr. La pastille est préparée en comprimant le mélange dans une matrice en acier. Les échantillons sont analysés à l'état solide sous forme d'une poudre.

III.5. Formulations inventées :

On a essayé d'utiliser nos matières premières obtenues : le chitosane et la kératine dans des différentes formulations comme les savons et les crèmes.

III.5.1. Les savons : (Figure .1)

a. Savon à base de chitine : (100g)

(Huile de cacao plus Huile d'olive)	69 %
NaOH.....	9.6 %.
Eau distillée.....	20 %
Chitine.....	0.4 %
Additifs (vitamine)	2.1 %

b. Savon1 à base de kératine extraite de laine : (50g)

Huile d'olive.....	34.5 %
NaOH.....	4.5 %
Eau distillée.....	9.5 %
Solution de kératine extraite de laine.....	0.5 %
Additifs (colorant).....	.0.5 %

c. Savon2 à base de kératine extraite de laine : (50g)

Huile d'olive.....	34 %
NaOH.	4.5 %
Eau distillée.....	10 %
Solution de kératine extraite de laine.....	0.7 %
Additifs (colorant).....	0.4 %

d. Savon simple témoin (sans principe actif) : (50g)

Huile d'olive.	34.5 %
NaOH.....	4.5 %
Eau distillée.....	9.5 %
Additifs (colorant).	0.5 %

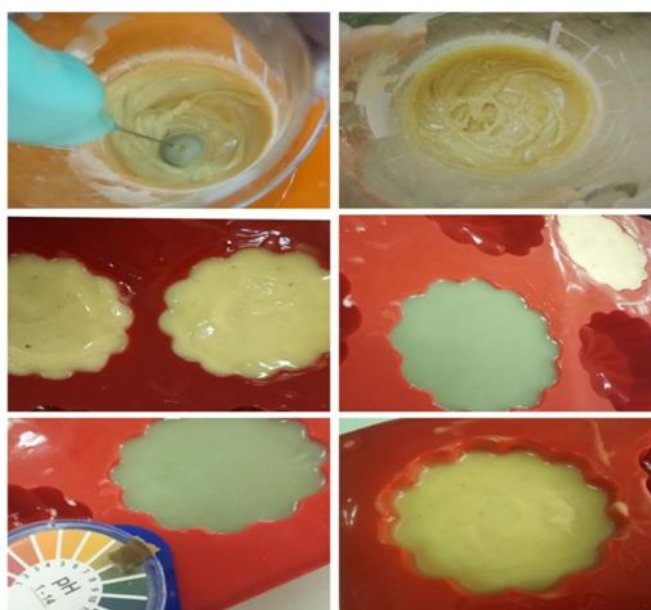


Figure 1. Les savons fabriqués à partir les différentes matières premières obtenues

(a. b. c. d)

III.5.2. Crème hydratante à base de kératine extraite de laine : (100g) (Figure 2.)

***Phase 1 :**

Huile de ricin.....	1 %
Vaseline.....	10 %
Glycérine.....	10.5 %

***Phase 2**

Tween.....	2 %
La gomme adragante	10 %
Eau distillée	65 %
Kératine.....	5 %
Additifs (parfum)	0.5 %
Conservateur (acide benzoïque)	2 %



Figure .2. La crème fabriquée à partir de la solution de kératine de laine

III.6. Activités biologiques

III.6.1. Activité antioxydante

Le DPPH est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante et en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 517 nm. Le protocole expérimental suivi pour étudier l'activité du piégeage du radical libre DPPH est celui qu'a décrit dans le littérature en apportant quelques modifications [5] où :

On a préparé des solutions mères de 0,005g de chitosane, de savons à base de chitosane, de savons à base de kératine et du crème dans 5 ml de méthanol, et aussi des solutions mères de 1.4 ml de kératine issue de la laine, de kératine issue des plumes dans 1 ml de méthanol.

Ensuite, on a préparé des solutions avec 5 différentes concentrations à partir de chaque solution mère où on a prendre 200 ul de ces dernières ajoutant différents volumes de méthanol.

On a préparé le Blanc prenant 100 ul de méthanol avec 1 ml de solution de DPPH qu'on a déjà fait, et puis nos solutions diluées prenant 100 ul de chaque solution fille et lui ajoute 1 ml de solution DPPH, l'incubation est pour 30 minutes à la température ambiante, l'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 517 nm. Les essais ont été effectués deux fois afin de vérifier la reproductibilité.

La capacité de piégeage des radicaux libres DPPH (%) a été déterminée selon la formule suivante : [9]

$$I (\%) = \left| \frac{Abs_{517 \text{ nm de contrôle}} - Abs \text{ d'échantillon}}{Abs_{517 \text{ nm de contrôle}}} \right| \times 100 \dots\dots\dots(4)$$

Avec :

I % : Le pourcentage d'inhibition (Capacité de piégeage des radicaux libres DPPH).

Abs_{517nm} : Absorbance du radical (DPPH•) (t = 0 min).

Abs d'échantillon : Absorbance de l'échantillon contenant une dose du dérivé testé (t= 30 min).

La concentration des échantillons synthétisés provoquant 50% d'inhibition (CI₅₀) du radical (DPPH•), est déterminée graphiquement par la régression linéaire à partir du graphe des pourcentages d'inhibition (I %) en fonction de concentrations (C) des échantillons.

III.6.2. Activité antibactérienne

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne du chitosane, de la kératine issue de la laine, de la kératine issue de la plume et de la crème, du savon à base de la kératine (laine) et du savon à base du chitosane, on a utilisé trois bactéries : à Gram positif (*S. aureus* ATCC 25923) et deux souches à Gram négatif (*E. coli* ATCC25924 et *P. aeruginosa* ATCC27853).

Ces souches ont été fournies par le Laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université Mohamed Boudiaf -M'sila, et ont été transférées dans 3mL d'un milieu nutritif dans un tube à essais de 22 ml, puis une suspension dans de l'eau physiologique a été préparée.

La culture obtenue a été diluée afin de donner une concentration approximative de 10⁶ à 10⁸ UFC / ml (0,5 Mc Ferland standard) en conformité avec les recommandations par CLSI (2020).

L'activité antibactérienne des sept échantillons est évaluée par la méthode de diffusion de disque. L'obtention de l'inoculum final s'effectue de la manière suivante : Chaque culture bactérienne est ensemencée en stries sur une gélose nutritive pour obtenir des colonies bien isolées. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, quelques colonies sont transférées à l'aide d'une anse de platine dans un tube à essai contenant de l'eau physiologique. Les

densités optiques sont ajustées à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 625 nm. La densité optique doit être comprise entre 0,08 et 0,1 l'équivalent de 10^8 UFC/ml. L'inoculum ainsi préparé est dilué au 1/100^{ème} dans de l'eau physiologique. La densité optique finale obtenue de l'inoculum doit être équivalente à 10^6 UFC/ml. Les boîtes de pétri contenant le milieu Muller Hinton gélosé sontensemencées par inondation. Des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre préparés en extemporané sont stérilisés par autoclavage, puis imprégnés les échantillons à tester dissous dans le DMSO (10µL pour chaque disque).

Les disques sont placés aseptiquement sur la gélose préalablement inoculée. Les boîtes sont laissées une heure à température ambiante, ensuite retournées et incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Après incubation, l'activité antibactérienne est déterminée par mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques. L'absence de croissance bactérienne se traduit par un halo translucide autour du disque. (**Figure. IV.1**)



Figure .IV.1. Différentes étapes de l'étude de l'activité antibactérienne

III.7. Analyses des savons et de crème obtenus

III.7.1. Taux d'humidité

Le principe est basé sur le séchage de la matière étudiée à 103°C, jusqu'à l'obtention d'une masse constante.

Mode opératoire : Chauffer une prise d'essai environ 0.01mg à l'étuve à 110°C pendant quatre heures (jusqu'à élimination complète de l'eau) puis déterminer la perte en masse.

Le taux d'humidité est calculé par la relation suivante :

$$H (\%) = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \quad \dots\dots\dots (5)$$

H (%) : Taux d'humidité.

M₁ : Masse de la prise d'essai avant le séchage.

M₂ : Masse de la prise d'essai après le séchage.

III.7.2. Mesure du pH

On a préparé une eau savonneuse à partir de 0.02mg des trois échantillons (savon à base du chitosane, savon issu de la kératine de la laine et crème) test mou et 10 ml d'eau distillée, et ensuite on a mesuré le pH de l'eau savonneuse à l'aide d'un pH mètre. Le processus est répété chaque jour jusqu'à deux mois et demi, une période suffisante pour que le pH se stabilise.

Références Bibliographiques

- [1]. Crini.G ; Badot.P.M ; Guibal.E, Chitine et Chitosane Du polymère à l'application, *Presses universitaires de Franche-Comté*, **2009**.
- [2]. El Knidri.H; Belaabed.R; Addaou.A; Laajeb.A et Lahsini.A, Eco-friendly extraction and characterization of chitin and chitosan from the shrimp shell waste via microwave irradiation, *Process Safety and Environmental Protection*, **2016**, 104 : pp395-405.
- Désacétylation
- [3]. Annouar.S ; Soufiane.A ; Mountadar.M, Etude de la Dénitratation par des Adsorbats Naturels (Chitine et Chitosane), *Revue Francophone d'Ecologie Industrielle - n°37- 1er trimestre*, Université d'El Jedida, Maroc, **2005**, pp34-51.
- [4]. No. H.K; Meyers. S.P & Lee. S, Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste, *Journal of agricultural and food chemistry*, **1989**, (37): 575-579.
- [5]. Feroz S, Muhammad N, Ranayake J, Dias G. Keratin - Based materials for biomedical applications. *Bioact Mater.* **2020** ; 5 :496–509.

Chapitre IV

Résultats

Et Discussions

Partie A

IV-1- Rendement en chitine

Le rendement en chitine est la différence de poids entre la matière première avant et après hydrolyse (**Tableau. IV.1**). Il est obtenu selon la formule suivante:

$$\text{Rdt \%} = \frac{100.M_1}{M_2} \dots\dots\dots (1)$$

Avec :

Rdt : Rendement en chitine

M₁: Masse des poudres de carapaces avant hydrolyse

M₂: Masse des poudres de chitine après hydrolyse

Tableau. IV.1. : Les rendements de l'extraction de la chitine pour chaque étape.

Traitement	Déminéralisation	Déprotéinisation	Décoloration
Rendement %	79,43	70,57	14,46

D'après les rendements calculés, on remarque une perte de masse importante après chaque traitement ce qui peut être expliqué par la solubilisation des sels minéraux présents dans la composition des carapaces de crevette et la dissociation du complexe chitine-protéine (Chitinoprotéine), ainsi que l'élimination des pigments tel que les dérivés de β -carotène.

Ces résultats nous confirment l'efficacité des traitements d'isolation de la chitine. Le temps de réaction a aussi un effet important sur l'efficacité d'extraction. Plus on augmente l'intervalle de temps, plus on assure la pureté de la chitine. En effet, on retrouve dans la littérature, entre 15 et 35 % de chitine dans la carapace de diverses espèces de crevettes, mais comme il a déjà été mentionné dans la bibliographie, les conditions drastiques peuvent conduire à la dépolymérisation ou la dégradation du biopolymère. [1-3]

IV-2-Analyses physico-chimiques de la chitine

La chitine obtenue subit des analyses physico-chimiques comme celles effectués sur les poudres de déchets de carcasse de crevettes.

IV-2-1-Caractéristiques physico-chimiques de la chitine

La chitine a été analysée physico chimiquement pour voir les pourcentages des composants contenant dans la chitine et pour pouvoir calculer le degré de déminéralisation et de déprotéinisation, pour connaître l'efficacité de ces réactions. Le tableau suivant résume les caractéristiques physico-chimiques de la chitine.

Tableau. IV.2 : Caractéristiques physico-chimiques de la chitine

Caractéristiques	Chitine
Humidité %	6.15*
Matière sèche%	95.77*
Cendres %	0.0074*
Couleur	Jaune blanchâtre

*pourcentage en poids sec

La teneur en matière sèche dans la chitine est de 95.77% ceci implique une humidité égale à 6.15 %. Ces résultats illustrent que les conditions de la déminéralisation, déprotéinisation réalisés durant ces études permettent une très bonne extraction de la chitine à partir des crevettes.

IV-2-2-Caractérisation de la chitine par la spectroscopie IR

Le spectre montre une large bande à 3110 à 3444 cm^{-1} qui correspond aux vibrations d'élongation de $-\text{NH}$ et $-\text{OH}$. Les absorbances des pics à 2885- 2958 cm^{-1} sont dues aux vibrations d'élongation de $-\text{CH}$ et $-\text{CH}_2$. Deux pics caractéristiques de la chitine apparaissent à 1652 et 1565 cm^{-1} qui sont respectivement dus aux vibrations d'élongations de la liaison $\text{C}=\text{O}$ carbonyle amide et celle de l'amide $\text{N}-\text{C}=\text{O}$. Des bandes correspondantes aux vibrations de déformation de $-\text{NH}$ et $-\text{OH}$ se situent respectivement à 1565 cm^{-1} et à 1260 cm^{-1} (**Figure. IV.2**)

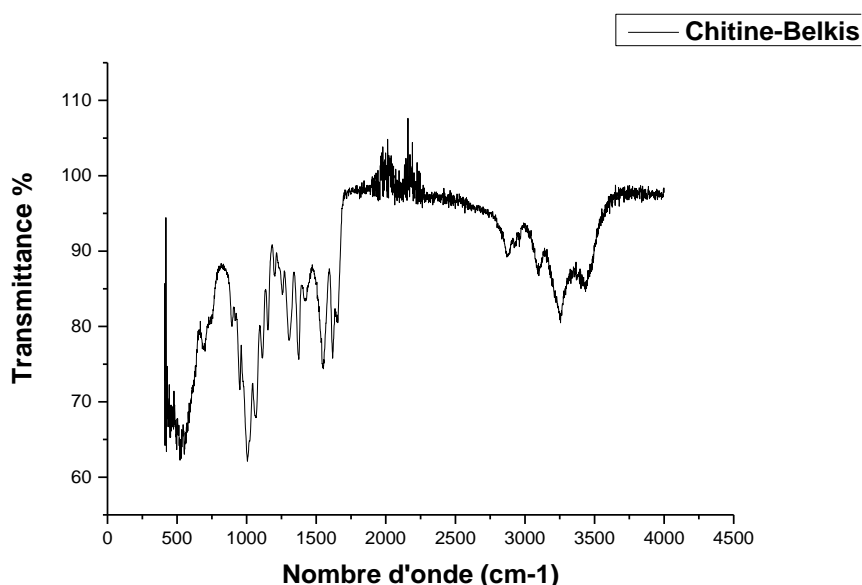


Figure. IV.2 : Spectre IRTF de la chitine

Les principales bandes des spectres IRTF de la chitine sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau. IV.2.1: Principales bandes des spectres IRTF de la chitine

Bandes (cm^{-1})	Liaison	Nature de la vibration
3110, 3271, 3444	N-H, O-H	Élongation
2885, 2958	C-H, CH_2	Élongation
1652	$\text{C}=\text{O}$ carbonyle amide	Élongation
1565	$\text{N}-\text{C}=\text{O}$ amide	Déformation
1260	O-H	Déformation
1208	C-N	Élongation
1117	C-O de la liaison C-O-C	Élongation
1069	C-O de la liaison CH-O-C	Élongation
899	C-H	Déformation

La détermination du DA est donnée selon la formule suivante :

$$DA \% = \left[1 - \frac{A_{1560}}{A_{2875}} \times \frac{1}{1.33} \right] \dots \dots \dots (2)$$

Où :

A1560 : Intensité de la bande d'absorption de déformation de N-H

A2875 : Intensité de la bande d'absorption des élongations des fonctions C-H

Le DA et le DD sont les principales caractéristiques physico-chimiques de la chitine. La valeur du DA obtenu de la chitine est de 70.21%. Ce résultat montre une valeur de DA supérieur à 50%, qui est le cas de la chitine et de DD proches de 30% pour la chitine. Ceci est peut-être la conséquence du traitement basique lors de la déprotéinisation.

Partie B

IV-3-Caractères de chitosane

IV-3-1-Degré d'acétylation et de désacétylation du chitosane

D'après les résultats présentés, on constate que cette transformation chitine au chitosane enregistre un rendement en chitosane relativement modeste surtout quand le temps de réaction est élevé (**Tableau. IV.3**).

Tableau. IV.3: Rendement de chitosane

Masse de la chitine désacétylée (g)	13
Masse du chitosane obtenu (g)	5.22
Rendement (%)	45.27

Le mécanisme de désacétylation, n'est pas encore connu, néanmoins on peut confirmer que la concentration alcaline, la température et la durée du traitement ont une grande influence sur le degré de désacétylation. Ces paramètres peuvent amener les utilisateurs à contrôler la désacétylation.

IV-3-2-Caractérisation du chitosane

Les spectres obtenus par spectroscopie Infrarouge pour le chitosane sont présentés dans la **figure. IV.3**.

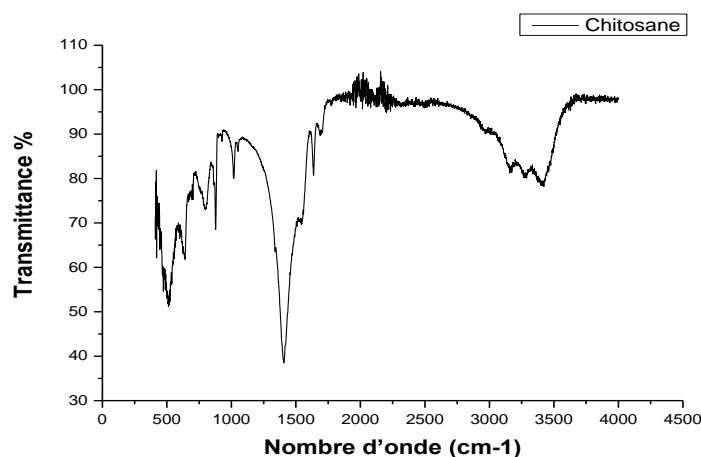


Figure. IV.3 : Spectre Infrarouge du chitosane

Les principales bandes caractéristiques du chitosane sont groupées dans le **tableau. IV.4**. Comme la transformation de la chitine introduit des groupements NH₂ libres en substitution aux

NH-CO-CH₃ une bande d'absorption apparait plus intense à 3500cm⁻¹ pour le chitosane que pour la chitine. Cette bande spécifique a été utilisée pour calculer le taux de désacétylation de la chitine à partir des spectres des différents grades de chitosane.

Tableau. IV.4 : Les principales bandes du spectre Infrarouge de chitosane

Bandes (cm ⁻¹)	Nature de vibration ou de rotation
3450-3312	Élongation de la liaison N-H et O-H
2870- 2890	Élongation de la liaison C-H
1650	Déformation Amide I, Vibration de valence C=O
1585	Vibration de déformation de la liaison N-H (amide II)
1460	Déformation O-H
1420-1430	Déformation CH ₂
1378	Déformation CH
1335	Déformation OH
1155	Pont éther ou Élongation asymétrique C-O-C
1090	Élongation de la liaison C-O
999	Élongation de la liaison C-O ou C-C
896	Vibration de C-H

On remarque la présence des pics caractéristiques à 3446 (bande O-H), à 2887 (bande C-H), à 1658 (bande N-H), 1073 (bande du pont O) et à 755 (bande de C-O). La présence du groupement amine au niveau de la chitine et du chitosane est bien visible (pic à 1658), le DD est de l'ordre de 70.21% de la chitine.

IV-3-3-Tests de solubilité

Le chitosane peut se solubiliser dans des solutions acides, mais il est insoluble dans l'eau, les solvants organiques et les bases aqueuses. En effet, le chitosane est une base forte et possède des groupes d'amines primaires avec un pKa égal à 6,3. À cause de la présence des groupes amines, la charge et les propriétés du chitosane varient avec le pH. La solubilité est aussi dépendante de la nature de l'acide utilisé, de la force ionique et de la distribution des groupes acétyle sur la chaîne macromoléculaire. Le solvant le plus couramment utilisé pour la solubilité du chitosane est l'acide acétique en solution aqueuse.

Le tableau. IV.5. Résume les tests de solubilité des différents adsorbants.

Tableau. IV.5 : Tests de solubilité des différents adsorbants

Solvant	Solubilité
Eau froid	Insoluble
Eau chaud	Peu soluble
NaOH (0,1M)	Insoluble
CH ₃ COOH (5 %)	Soluble
HCl (1%)	Soluble
DMSO	Soluble
DMF	Soluble

Le chitosane est soluble dans l'acide acétique à 5% par rapport à l'autre solvant utilisé dans ces tests de solubilité.

Partie C

IV.4. Activité biologique

IV.4.1. Activité antioxydante

Dans ce travail, on a évalué, in vitro, l'activité antioxydante des six échantillons par la mesure de la capacité de piégeage des radicaux libres DPPH^{*} (Figure. IV.4).

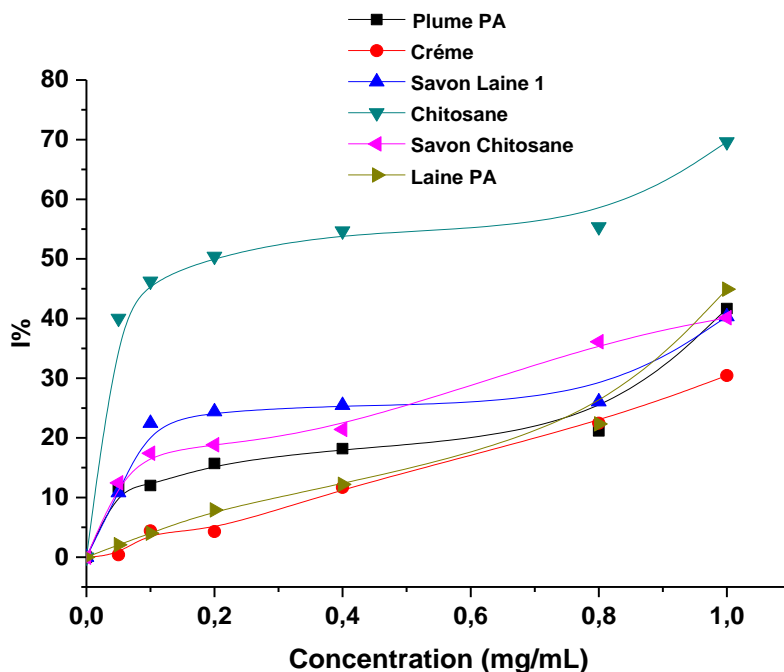


Figure. IV.4 : Activité de piégeage du radical DPPH effectuée pour les six échantillons

À partir des courbes des pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées, on a déterminé les valeurs d'IC₅₀ (Figure. IV.5).

Le Tableau IV.6 résume les résultats obtenus de l'évaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH^{*}.

Tableau IV.6. Valeurs de IC₅₀ des six échantillons tests pour le piégeage du radical DPPH^{*}

	R ²	y = ax + b	IC ₅₀ (mg/ml)
Chitosane	R ² = 0.8388	y = 23.466 x + 42.755	3.238
Kératine (Plume)	R ² = 0.8005	y = 25.537 x + 9.215	1.597
Kératine (Laine)	R ² = 0.9075	y = 39.071 x - 1.0258	1.305
Crème	R ² = 0.9893	y = 30.049 x - 0.4943	1.680
Savon à base de la kératine (laine)	R ² = 0.7016	y = 20.128 x + 16.364	1.671
Savon à base du chitosane	R ² = 0.9774	y = 27.932 x + 12.505	1.342

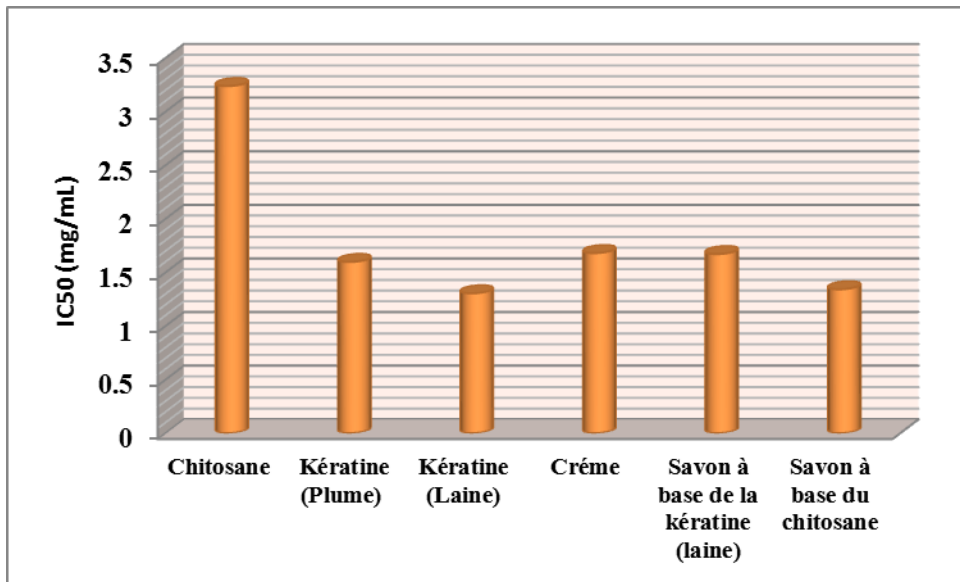


Figure. IV.5. Histogrammes d'IC₅₀ des six échantillons

Parmi les six échantillons, la kératine issue de la laine représente l'échantillon le plus actif, leur IC₅₀ est de 1.305 mg/ml, suivi par le savon à base du chitosane avec une IC₅₀ de l'ordre de 1.342 mg/ml, puis il vient l'extrait de la kératine issu de la plume d'ordre 1.597mg/ml, est enfin le chitosane avec une IC₅₀ de l'ordre de 3.238 mg/ml.

IV.4.2. Activité antibactérienne

Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induite pour l'extrait et leurs complexes et matrices sont regroupés dans le **tableau. IV.7.**

Tableau. IV.7. Concentrations de l'activité antibactérienne et les diamètres

Les échantillons	(mg/ml)	Diamètre de zone d'inhibition (mm)		
		<i>E. Coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Chitosane	200	9	6	6
	150	8	6	8
	100	8	6	7
	75	10	6	9
	50	10	6	6
	25	11	8	6
Savon à base du chitosane	200	6	8	8
	150	6	7	6
	100	6	7	7
	75	6	6	7
	50	6	7	6
	25	6	8	6
Kératine (Laine)	200	6	6	11
	150	6	6	6
	100	6	6	8
	75	6	6	8
	50	6	6	6
	25	6	6	6
Savon à base de la kératine (laine)	200	9	7	9
	150	6	7	7
	100	8	6	8
	75	8	8	8
	50	7	8	8
	25	8	8	6
Savon (Laine 2)	200	9	7	9
	150	6	7	7
	100	8	6	8
	75	8	8	8
	50	9	8	8
	25	9	8	6
Kératine (Plume)	200	7	6	6
	150	8	6	6
	100	8	6	6
	75	8	6	6
	50	11	6	6
	25	11	6	6
Crème	200	6	6	8
	150	6	6	6
	100	6	6	6
	75	6	6	6
	50	6	6	6
	25	6	6	6

D'après le **tableau. IV.7** les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent que : Les souches les plus sensibles à notre échantillons étaient *E. Coli*, à une concentration de 75 et 25 mg/ml dont le diamètre d'inhibition est égal à 9 et 11 mm, et pour la bactérie *S. aureus*, dont la zone d'inhibition est de diamètre 6 et 8 mm pour une concentration 25 mg/ml.

Nos résultats montrent que l'activité du chitosane à la concentration de 75 et 25 mg/ml dans les deux cas est plus marquée avec la souche d'*E. Coli* bactérie à Gram négatif qu'en présence d'une bactérie à Gram positif notamment *S. aureus*.

Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que la kératine issue de la plume a un pouvoir antibactérien modérément inhibiteur.

La chitosane et la kératine issue de la plume (produit brut) a montré une activité modérée vis-à-vis l'*E.Coli* même à des faibles concentrations. Ce qui concorde avec l'étude bibliographique qui étaye que chitosane a été reconnu depuis longtemps en biologie moléculaire par son action dans le traitement des infections bactériennes.

IV.5. Résultats des analyses effectuées sur les savons et la crème

IV.5. 1. pH du savon

Les valeurs des pH des quatre savons et du crème (**Figure. IV.6**) :

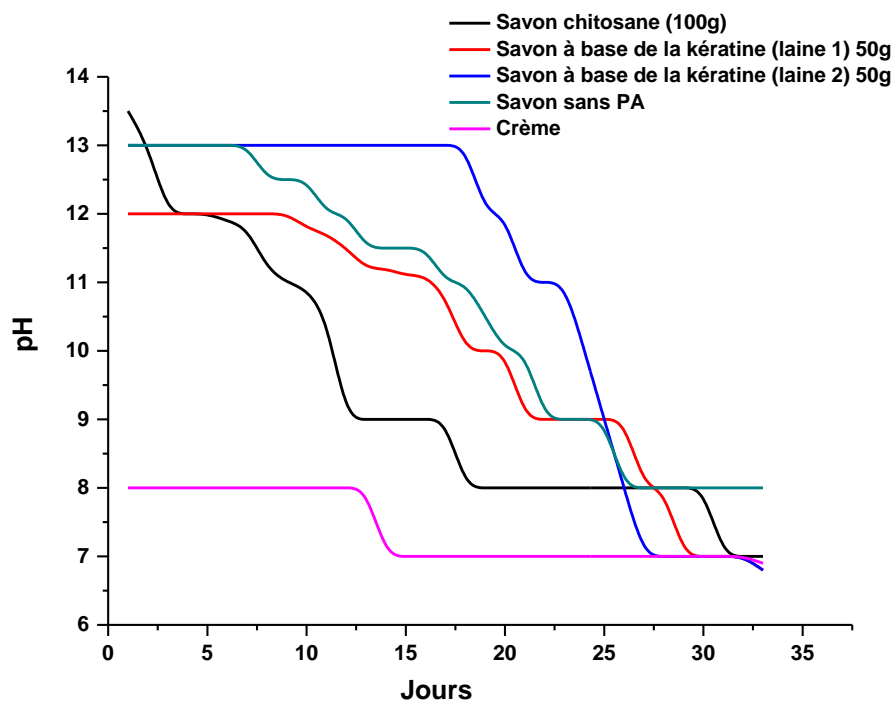


Figure. IV.6. L'évaluation de pH des quatre savons pendant un mois

Pour les trois savons dû à la kératine issue de la laine, la kératine issue de la plume et savon seul le pH est de **6.8 à 7** cette valeur signifie que le savon est doux et ne provoque pas d'irritation après une utilisation quotidienne.

Concernant le savon du chitosane, le pH est de **8.2**, ce pH alcalin est favorable pour lutter contre les champignons. Cependant son utilisation est seulement recommandée en cas d'infection. Afin de ne

pas déséquilibrer le film hydrolipidique qui assure une défense naturelle contre le développement des bactéries et les irritations...etc.

Les résultats des analyses effectuées sur ces savons sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau. IV.8. récapitulatif des analyses effectuées sur les deux types des savons

Savons	H (%)	pH	Pouvoir moussant
Savon chitosane (100g)	65	8.2	Bon
Savon à base de la kératine (laine 1) (50g)	-	7	Très bon
Savon à base de la kératine (laine 2) (50g)	-	6.8	Très bon
Savon sans PA	55	7	Très bon

H : Taux d'humidité

IV.5.2. Humidité

Les taux d'humidité obtenus pour les quatre types des savons sont conformes à la norme qui est entre 55% et 65%.

Conclusion générale

Faire des déchets une matière première pour la réalisation des produits innovants est une stratégie très recherchée à l'heure où l'environnement et l'innovation sont des priorités vitales pour le présent et le futur de l'humanité.

La valorisation des exosquelettes de crevettes en chitosane a été réalisée par la technique hydrothermo-chimique en quatre étapes, le chitosane obtenu par cette technique est de bonne qualité. En effet, le degré de désacétylation est supérieur à 50% dans les conditions optimales pour la protéination et la désacétylation simultanée. Cette technique présente l'intérêt d'être plus simple et plus sécuritaire.

Les plumes et la laine sont très abondantes et facilement accessibles, ce qui les rend la matière kératinique la plus adéquate pour la production de la kératine dans le cadre de valorisation de ces agro-déchets qui présente un problème de pollution pour l'environnement. Les méthodes qu'on a adoptées consistent à produire la kératine à partir des plumes et de la laine sans altérer sa structure en utilisant le DMSO comme solvant d'extraction et par traitement alcalin utilisant solution de NaOH. La kératine obtenue est ensuite caractérisée par des analyses physiques et chimiques.

L'étude de l'activité antioxydante du chitosane, de la kératine issue de la laine, de la kératine issue de la plume, du savon et de crème à base de la kératine (laine) et du savon à base du chitosane par l'utilisation de la méthode de DPPH, a montré que la kératine issue de la laine représente l'échantillon le plus actif, leur IC₅₀ est de 1.305 mg/mL, tous les échantillons sont capables de donner un effet inhibiteur important même à des faibles concentrations.

Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que la kératine issue de la plume a un pouvoir antibactérien modérément inhibiteur. La chitosane et la kératine issue de la plume (produit brut) a montré une activité modérée vis-à-vis l'*E. Coli* même à des faibles concentrations. Ce qui concorde avec l'étude bibliographique qui étaye que chitosane a été reconnu depuis longtemps en biologie moléculaire par son action dans le traitement des infections bactériennes.

À la fin, on a préparé des savons à base de la kératine issue de la laine et de la kératine issue de la plume à usage quotidien et à base du chitosane mou antiseptique. Selon la formulation de ces savons ils peuvent aider à nettoyer et nourrir la peau.

Malgré tous les obstacles, comme le manque de temps, le manque de matériel et des moyens de travail nécessaires, les résultats ont été bons et encourageants, et j'essaierai de créer d'autres formulations, meilleures, conformes et de haute qualité.