

2. Le chitosane

2.1. Définition et principales caractéristiques

Le chitosane, parfois appelé chitine désacétylée est un polysaccharide linéaire dérivé de la désacétylation partielle de la chitine (Cheung *et al.*, 2015). Sa structure chimique semblable à celle de la cellulose (De alvarenga, 2010) et qui s'adresse à toute une famille de copolymères est composée d'un arrangement aléatoire d'unités de D-glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine liées entre elles par des liaisons β -(1-4) (Figure 5) (Caroline *et al.*, 2006).

Possédant trois groupements fonctionnels, un groupement amine et deux groupements hydroxyles en positions C₂, C₃ et C₆ respectivement, la nature cationique du chitosane lui confère une propriété particulière comparée à la majorité des polysaccharides qui sont généralement soit neutres, soit chargés négativement dans un milieu acide. Ce biopolymère est soluble au-dessous de son Pka (proche de 6,3) et se voit attribuer une charge positive grâce à ses fonctions amines libres. Une particularité comme déjà citée précédemment rare et qui lui permettra de former des complexes électrostatiques ou des structures multicouches avec d'autres polymères synthétiques ou naturels chargés négativement (Cheung *et al.*, 2015).

La biocompatibilité, la biodégradabilité, le faible pouvoir allergène et la non toxicité du chitosane sont toutes des caractéristiques qui lui permettent d'être utilisées dans diverses applications.

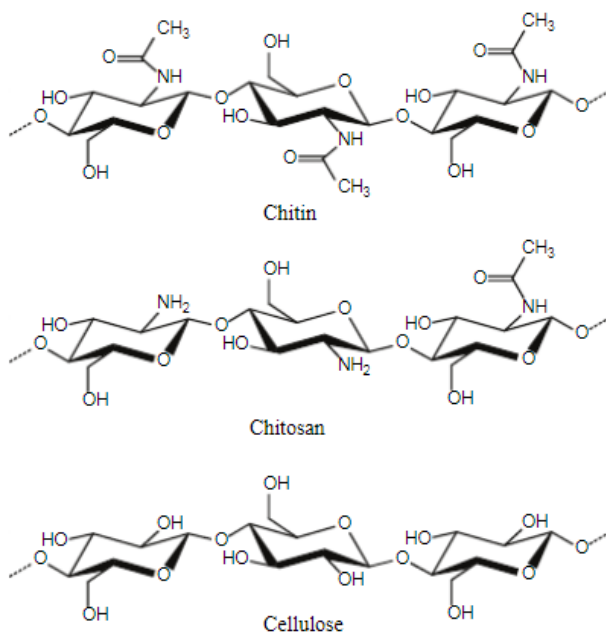


Figure 5. Structure chimique de la chitine, du chitosane et de la cellulose (De alvarenga, 2011).

2.2. Sources de chitosane

Le chitosane ne se trouve que rarement dans la nature. Il n'est présent que dans la paroi d'une classe particulière de champignons les Zygomycètes, et chez quelques insectes au niveau de la paroi abdominale des reines termites par exemple. (Seng, 1988). Il n'y a donc pas vraiment de sources primaires de chitosane exploitable, et la source majeure provient de la désacétylation de la chitine obtenue à partir des carapaces de crustacés (crabes, langoustes, crevettes et écrevisses) qui représentent la source naturelle la plus abondante (Figure. 2).

Cependant, d'autres sources de chitine (et donc de chitosane) sont apparues au niveau des autres règnes biologiques, elle est signalée dans les parois cellulaires des champignons et de certaines algues chlorophycées, au niveau de l'endosquelette des céphalopodes, ainsi que dans la paroi de certaines levures et bactéries (Figure 6).

Le meilleur rendement d'extraction de la chitine est actuellement observé chez les crustacés qui en constituent la principale source au niveau industriel (Crini *et al.*, 2007).

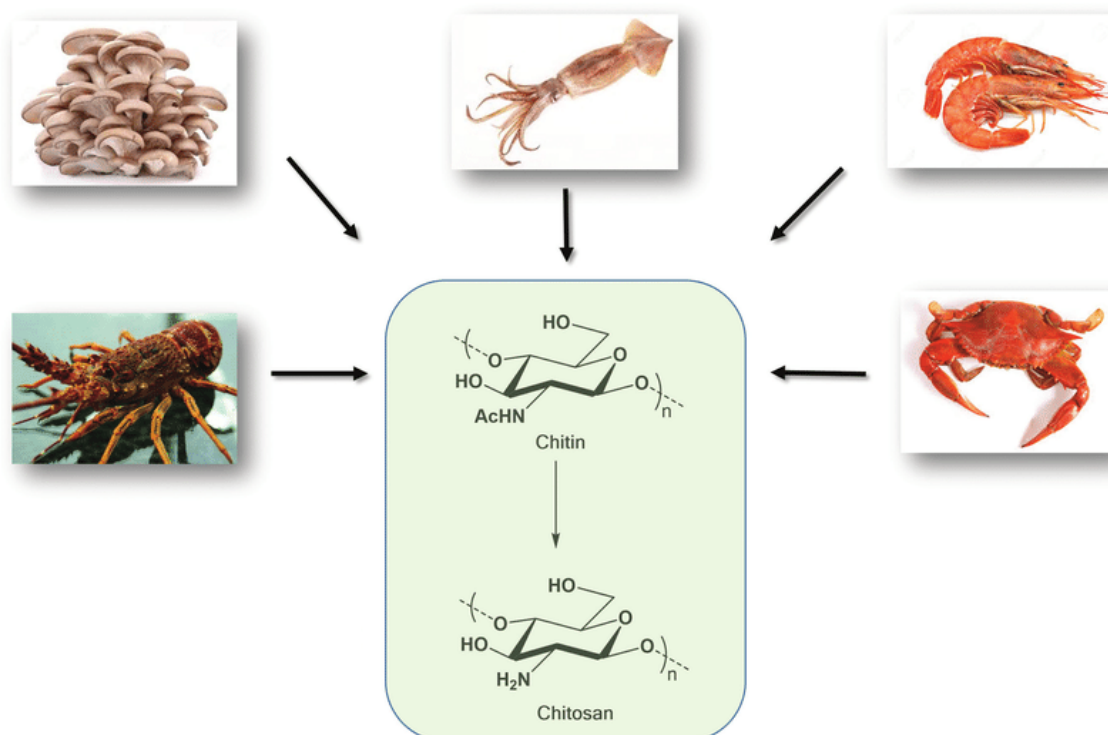


Figure 6. Sources de chitine et de chitosane (Jardin et Sayed, 2017).

2.3. Processus d'obtention du chitosane

2.3.1. Extraction de la chitine

La plupart des techniques d'extraction développées pour obtenir la chitine, reposent sur des processus chimiques d'hydrolyse des protéines et d'élimination des matières inorganiques. Certains procédés incluent une étape de décoloration de la chitine extraite, réalisée le plus souvent par des agents oxydants.

Pour obtenir du chitosane, une étape supplémentaire de désacétylation est nécessaire.

2.3.1.1. La déminéralisation

La déminéralisation est une étape de traitement qui consiste à éliminer la matière minérale liée à la chitine par hydrolyse acide sous agitation.

Le principal composant inorganique de la carapace des crustacés est le CaCO_3 , qui est généralement éliminé à l'aide de solutions diluées de HCl (jusqu'à 10%) à la température ambiante, bien que d'autres acides (HNO_3 , HCOOH , H_2SO_4 et CH_3COOH) puissent être utilisés. La concentration de l'acide et la durée du traitement dépendent de la source, mais les traitements à des températures plus élevées, entraînant la dégradation du polymère, doivent être évités (Marinela et *al.*, 2018).

2.3.1.2. La déprotéinisation

Dans cette étape, les protéines liées à la chitine sont éliminées par hydrolyse basique en utilisant une solution aqueuse diluée de NaOH à une température assez élevée (entre 65°C et 100°C) (Aljawish, 2013). D'autres agents peuvent également être utilisés pour extraire les protéines, parmi lesquels, on cite : le Na_2CO_3 , NaHCO_3 , KOH, K_2CO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Na_2SO_3 , NaHSO_3 , Na_3PO_4 et Na_2S (Badaoui, 2012).

Les procédés de déprotéinisation utilisant des extraits enzymatiques ou des enzymes isolés et des fermentations microbiologiques ont été testés avec succès, mais la variante du traitement enzymatique/microbiologique, laisse généralement 1 à 7% de protéines résiduelles en plus du temps consommé (Crini et *al.*, 2007).

2.3.1.3. La décoloration ou blanchiment

C'est une étape qui consiste à éliminer les pigments liés à la chitine comme la lutéine ou la β -carotène par un traitement avec des agents oxydants tels que l' H_2O_2 ou le NaClO (Leroux et *al.*, 2012). Le rayonnement solaire est également utilisé dans les processus industriels.

2.3.2. Obtention du chitosane

2.3.2.1. Désacétylation de la chitine

La désacétylation de la chitine est réalisée par hydrolyse des groupes acétamides en milieu fortement alcalin, à haute température. Généralement, la réaction est conduite dans une phase hétérogène en utilisant des solutions concentrées de NaOH ou KOH (30-50%) à des températures supérieures à 100°C, de préférence dans une atmosphère inerte ou en présence de substances réductrices telles que le NaBH₄ ou le Na₂SO₃ pour éviter la dépolymérisation du polymère.

Les conditions spécifiques de la réaction dépendront de divers facteurs, tels que le produit de départ, le prétraitement et le degré souhaité de désacétylation (Anouar *et al.*, 2005).

La figure 7, résume d'une manière brève, les différentes étapes d'obtention du chitosane à partir des co-produits (têtes et carapaces) de céphalopodes et crustacés.

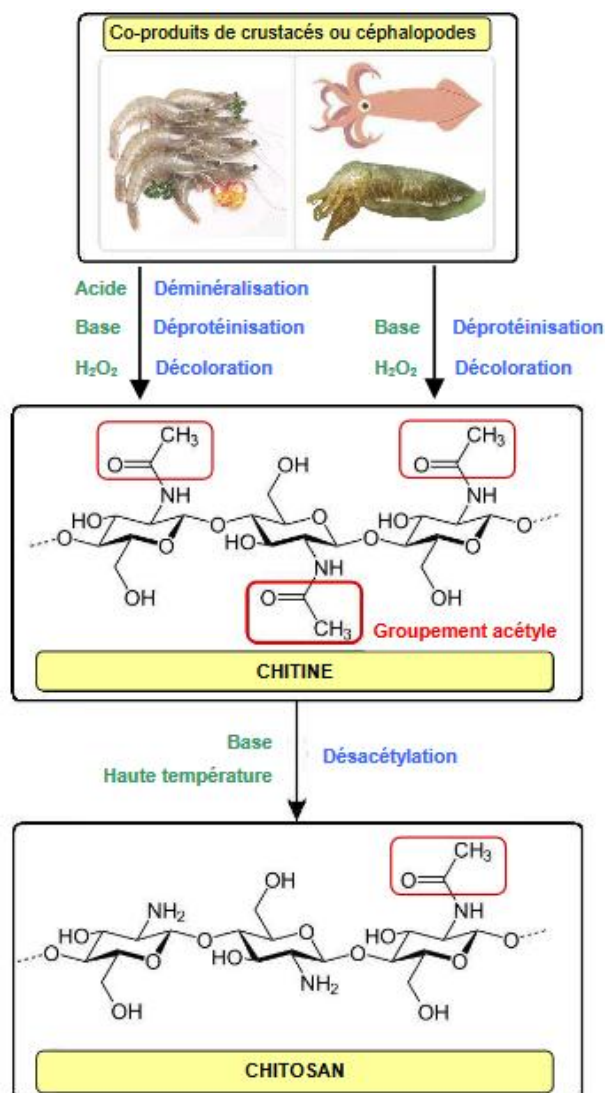


Figure 7. Procédés d'obtention de chitine et de chitosane (Ifremer, 2010).

2.4. Propriétés physicochimiques du chitosane

2.4.1. 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.

Etant 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 (Lyalina et *al.*, 2017).

Plusieurs méthodes sont fournies pour déterminer le degré de désacétylation du chitosane, on cite parmi eux : la spectroscopie IR, l'analyse élémentaire et la RMN sur des échantillons solides ou le dosage UV, titrage colloïdal et RMN liquide pour des échantillons en solutions (Rabiul et *al.*, 2014).

2.4.2. 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 (Kalut, 2008).

2.4.3. 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 inférieur à 6,0. Les acides organiques tels que les acides acétique, formique et lactique sont utilisés pour dissoudre le chitosane. Le plus couramment utilisé est une solution d'acide acétique à 1% à un pH d'environ 4,0 à titre de référence (Kalut, 2008).

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 (Roberts et Domszy, 1982). 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 (Kurita, 2006).

2.4.4. 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. 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) (Berth et *al.*, 1998).

2.5. Propriétés biologiques du chitosane

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

2.5.1. 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 (Varum et *al.*, 1997) qui dégradent les liaisons $\beta(1-4)$ glycosidiques des unités N-acétylglucosamine en des résidus N-acétylglucosamine et D-glucosamine, métabolisés ensuite dans l'organisme (Aljawish, 2013).

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 (Aljawish, 2013).

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 (Halla et Chaib, 2017).

2.5.2. Biocompatibilité

La biocompatibilité d'un polymère est d'une importance capitale pour une utilisation thérapeutique potentielle (Ueno et *al.*, 2001). Elle est caractérisée par trois propriétés principales : sa non toxicité, sa cytocompatibilité et son hémocompatibilité (Aljawish, 2013).

Le chitosane présente l'avantage de réunir également d'autres propriétés très intéressantes, il agit comme un agent bactériostatique et antifongique (Shi *et al.*, 2006).

2.5.3. Activité antimicrobienne du chitosane

Le chitosane présente une activité antimicrobienne face aux différents groupes de microorganismes : bactéries, virus, champignons, levures et moisissures (Juneja *et al.*, 2006). 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 quand a elle, dépend de la structure chimique du chitosane utilisé et des conditions environnementales lors de l'interaction (Cuero, 1999).

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 :

- 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 ;
- Le chitosane pourrait chélater des ions métalliques nécessaires à la croissance microbienne ou à la production de toxines ;
- Le chitosane interagit avec la membrane des cellules pour altérer sa perméabilité entravant ainsi l'entrée de certains nutriments (Crini *et al.*, 2007).

2.5.4. Activité antioxydant du chitosane

L'utilisation du chitosane comme antimicrobien, notamment dans les filières viandes et poissons, peut être justifié par son pouvoir antioxydant plus récemment identifié.

Les mécanismes mis en jeu dans cette activité antioxydante du chitosane et surtout de certains de ses dérivés comme le carboxyméthyl chitosane sont encore assez mal décrits et semblent être liés d'une part au caractère cationique de ces macromolécules et d'autre part à

leur pouvoir chélateur. Ainsi le carboxyméthyl chitosane en chélatant le fer libre issu des hémoprotéines libérées lors du stockage et/ou de la préparation de la viande va fortement ralentir le pouvoir catalyseur de ces ions sur le rancissement. L'action stabilisatrice des fonctions amines du chitosane sur les aldéhydes volatiles issus de la dégradation des acides gras insaturés semble également primordiale (Aljawish, 2013).

2.6. Principales applications du chitosane

Le chitosane est un biopolymère d'une importance croissante pour l'industrie et qui a des impacts significatifs sur la recherche et le développement dans des domaines aussi variés que la chimie, la biologie, la santé ou encore la protection de l'environnement. Ses propriétés exceptionnelles expliquent l'engouement pour cette macromolécule naturelle, extraite des carapaces de crustacés, considérée il y a encore peu comme des déchets.

Il s'est avéré que ce coproduit d'origine marine, très bon marché, peut participer à l'élaboration de nombreux produits commerciaux à haute valeur ajoutée et pratiquement, tous les domaines d'applications industrielles, de la pharmacie à l'agroalimentaire, en passant par l'environnement, l'agriculture, le textile, la papeterie et les cosmétiques, sont concernés. Parmi ces domaines, la diététique et le biomédical sont en plein essor (Muzzarelli, 1997). Nous présentons ici les plus prometteuses.

2.6.1. Domaine agroalimentaire

Dans les industries alimentaires, l'utilisation du chitosane n'est pas encore généralisée, à l'exception des pays asiatiques comme le Japon où de nombreux produits alimentaires enrichis en chitosane (nouilles, pâte de soja) sont trouvés. Aux Etats-Unis, le chitosane est utilisé comme ingrédient fonctionnel et comme film comestible pour protéger les aliments. En Europe, la réglementation sur l'utilisation du chitosane dans le domaine alimentaire est encore restrictive, il est utilisé comme un complément alimentaire (Crini et *al.*, 2007).

Les principales applications du chitosane dans le domaine agroalimentaire sont mentionnées dans le tableau 2.

Tableau 2. Principales application du chitosane en agroalimentaire (Crini et *al.*, 2007).

Domaine d'application	Exemples d'applications
Agroalimentaire <ul style="list-style-type: none"> • Alimentaire • Emballages 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Additifs (liant, émulsifiant, stabilisant, épaississant, de conservation) ✓ Restructuration des purées de fruits, de légumes ou de viande ✓ Stabilisation de la couleur et des arômes ✓ Clarification et désacidification des liquides alimentaires ✓ Préservation des aliments (antibactérien, antioxydant) ✓ Extraction du fer (mauvaise odeur dans les viandes) ✓ Support d'immobilisation d'enzymes ou de cellules (fromagerie, domaine diététique, aquaculture) ✓ Emballages biodégradables (comestibles)
Agriculture <ul style="list-style-type: none"> • Agricole • Animale 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Enrobage de semences (encapsulation) ✓ Immobilisation cellulaire (horticulture) ✓ Fongicide « bio-pesticide » ✓ Fertilisant, protection des cultures, traitement des sols ✓ Augmentation des rendements ✓ Films biodégradables (protection des récoltes, des feuillages) ✓ Alimentation animale ✓ Vaccination animale

2.6.2. Domaines biomédical et pharmaceutique

Les nombreuses propriétés biologiques du chitosane (biocompatibilité, bioactivité...) en font un candidat de choix pour les applications pharmaceutiques, biomédicales et cliniques comme agent antimicrobien, hémostatique, pansement cicatrisant...etc. Il est également utilisé comme un système de libération contrôlée d'agents thérapeutiques par voie orale, transdermique, oculaire et nasale (Chaussard, 2002). 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 (Bacon. et *al.*, 2000).

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 (Kumar, 2000).

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 (Prabaharan et *al.*, 2005).

2.6.3. Domaine cosmétique

Dans l'industrie des cosmétiques, les évolutions des réglementations françaises et européenne vis-à-vis de la santé publique et de l'environnement et la pression des consommateurs ont entraîné l'intégration de substances d'origine naturelle à la fois au niveau des produits, des formulations et des procédés. Ces tendances ont poussé au développement des recherches sur les macromolécules renouvelables, d'origine végétale ou marine, dont les polysaccharides. L'industrie cosmétique s'est également intéressée au chitosane car il présente diverses fonctions jouant ainsi plusieurs rôles lui permettant d'être utilisés dans des formulations cosmétiques contemporaines (Crini, 2006). En effet, le chitosane peut être utilisé à la fois comme agent hydratant, mouillant, tensioactif, épaississant, micro-encapsulant et/ou antimicrobien dans une même formulation cosmétique.