



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCEEN

MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : Chimie macromoléculaire

Par :

Mlle SERGHINE Lyli
Mlle CHIALI Wahiba

Sur le thème

Elaboration et caractérisation de films antimicrobiens à base de polysaccharide

Soutenu publiquement le 16 juin 2022 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mme BEDJAOUI Lamia
Mr BENMANSOUR Kamal
Mr GUENFOUD Fouad
Mme BELKAID Soraya

Professeur
Professeur
MCA
Professeur

UABB
UABB
UABB
ESSAT

Présidente
Encadrant
Examineur
Examinatrice

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu le tout puissant, qui nous a donné la santé, la volonté, et la patience pour mener à terme notre projet de fin d'études.

Ce mémoire de master a été réalisé au sein du laboratoire de recherche sur les macromolécules (LRM), à l'université Abou-BekrBelkaid Tlemcen, dirigé par Mr BERRAYAH Abdelkader. Nous tenons à le remercier infiniment de nous avoir accueillis au laboratoire.

*Nous tenons à remercier notre encadrant monsieur **BENMANSOUR Kamal** pour ses orientations, ses conseils, sa compréhension, et pour le temps qu'il nous a consacré durant la réalisation de ce travail.*

*Nous adressons, également, nos remerciements à tous les membres du jury, **Mme BEDJAOUI Lamia**, **Mr GUENFOUD Fouad***

*Et **Mme BELKAID Soraya**, qui nous ont fait l'honneur d'évaluer notre travail.*

Dédicaces

Nous dédions ce modeste travail

à nos chers parents,

à nos frères et sœurs,

à nos amis

et à toute personne chère pour nous

Tables des matières

Introduction Générale.....	12
-----------------------------------	-----------

Chapitre 1 Partie bibliographique

1.1 Les polysaccharides	16
1.2 L'amidon.....	16
1.2.1 Organisation morphologique des grains d'amidon.....	16
1.2.2 La composition moléculaire d'amidon.....	17
1.2.3 Amylose	18
1.2.4 Amylopectine	18
1.2.5 Propriétés de l'amidon	19
1.2.5.1 Hydrothermie	19
1.2.5.2 Hydrolyse.....	19
1.2.6 Le domaine d'utilisation d'amidon	21
1.2.7 Principaux acteurs sur le marché.....	21
1.3 Chitosane	22
1.3.1 Source et structure du chitosane.....	22
1.3.1.1 Source du chitosane	22

1.3.1.2	Structure du chitosane	24
1.3.2	Propriétés du chitosane	24
1.3.2.1	Solubilité.....	25
1.3.2.2	Masse moléculaire.....	25
1.3.2.3	Viscosité.....	25
1.3.2.4	Flexibilité	26
1.3.3	Propriétés antibactériennes du chitosane	26
1.3.3.1	Aspects microbiens	26
1.3.3.2	Influence du chitosane	27
1.3.3.3	Etat physique.....	27
1.3.3.4	Facteurs environnementaux	27
1.3.4	Applications	28
1.3.4.1	Dans le secteur agroalimentaire	28
1.3.4.2	Application dans le traitement des eaux.....	28
1.4	Huiles essentielles	29
1.4.1	Définition	29
1.4.2	Composition chimique d’huile essentielle de cannelle	29
1.4.3	L’extraction d’huile essentielle de cannelle.....	29
1.4.4	Propriétés physicochimiques d’huile essentielle de cannelle.....	30
1.4.5	Effet antibactérien de l’huile essentielle de cannelle	31

1.4.6	Application de la cannelle dans les industries alimentaires	31
Références bibliographiques		32

Chapitre 2 Partie expérimentale

2.1	Introduction.....	38
2.2	Matériel et produits	38
2.2.1	Matériel 38	
2.2.2	Produits 40	
2.3	Méthode de préparation des films.....	42
2.3.1	Préparation de la solution du chitosane.....	42
2.3.2	Préparation de la solution d'amidon	42
2.3.3	Préparation du mélange (Am+CH)	42
2.4	Méthodes de caractérisation	43
2.4.1	Spectrophotométrie FTIR	43
2.4.2	Spectrophotométrie Uv-vis	44
2.4.3	Microscopie optique MOP.....	45
2.4.4	Epaisseur du film	46
2.5	L'activité antibactérienne.....	47
2.5.1	Matériaux utilisé.....	47
2.5.1.1	Origine et choix des bactéries	47
2.5.1.2	Milieu de culture	47

2.5.2	Protocole expérimentale	47
2.5.2.1	Méthode de diffusion sur disque	47
	Références bibliographiques	49

Chapitre 3 Résultats et discussion

3.1	Aspect des membranes.....	51
3.2	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	53
3.3	Epaisseur et valeur d'opacité	54
3.4	Spectroscopie Uv-visible	55
3.5	Activité antibactérienne.....	56
	Conclusion Générale	60

Liste des figures

Figure 1 : Grains de différents amidons observés en microscope électronique à balayage (MEB)	17
Figure 2: structures de l'amylopectine et de l'amylose et représentation schématique du motif de ramification.	17
Figure 3: structure de l'amylose.....	18
Figure 4: structure de l'amylopectine.	19
Figure 5: Procédé de fabrication de la chitine et du chitosane.....	23
Figure 6: Structure chimique de la chitine et du chitosane	24
Figure 7: Balance analytique.....	38
Figure 8: Bain ultrasons	39
Figure 9: Etuve sous vide.....	39
Figure 10: Spectromètre FTIR	44
Figure 11: Spectromètre Uv-visible	45
Figure 12: Microscope optique.	46
Figure 13: Micromètre électronique	46
Figure 14: a) membrane (CH/AM/1% HEC), b) membrane (CH/AM/1,5% HEC), c) membrane (CH/AM/2% HEC)	51
Figure 15: Morphologie des membranes.....	52
Figure 16: Spectre IR du film témoin (Am+Ch) et du film (Am+Ch+1%cannelle)	53
Figure 17: Spectres UV-Visibles (375-800nm) des films à base de mélange amidon/chitosane/huile essentielle de cannelle avec des différentes concentrations (1%, 1,5%,2%).....	55
Figure 18: Activité antibactérienne des films de Ch/Am/HE de cannelle / <i>Staphylococcus aureus</i>	56

Figure 19: Activité antibactérienne des films de Ch/Am/HE de cannelle /*Escherichia coli*57

Figure 20: Activité antibactérienne des films de Ch/Am/HE de cannelle /*klebsiella pneumonea*.....57

Liste des Tableaux

Tableau 1: Fabricants d'amidon et de produits à base d'amidon	21
Tableau 2: corrélation entre les valeurs DD et la solubilité du chitosane à pH 6.....	25
Tableau 3: Différentes applications du chitosane	28
Tableau 4: propriétés physicochimiques de l'huile essentielle de cannelle	31
Tableau 5: principales caractéristiques du chitosane utilisé.....	40
Tableau 6: principales caractéristiques de l'amidon.	40
Tableau 7: principales propriétés du tween 80.....	41
Tableau 8: principales propriétés du glycérol	42
Tableau 9: composition de quatre formulations préparées B1 à B4.....	43
Tableau 10: épaisseurs, transmittance à 600nm et opacité.....	54

Liste des schémas

Schéma 01 : Diagramme représentatif d'hydrolyse chimique d'amidon... ..	20
Schéma 02 : principales méthodes d'extraction d'HE de cannelle... ..	30

Liste des abréviations

DDA: Degré de désacétylation

MM: Masse moléculaire

HE: Huile essentielle

HEC: Huile essentielle de cannelle

Ch: Chitosane

Am: Amidon

UV: Ultra-violet

Introduction Générale

Introduction générale

L'impact économique et social des maladies d'origine alimentaire ne cesse de croître, faisant de plus en plus de victimes chaque année. Cette problématique a conduit les récentes politiques de santé publique à s'appuyer sur l'analyse et le ciblage des risques de pollution. Les sources de contamination sont de réels risques pour la santé. Chacun de ces dangers doit être considéré en termes de fréquence ou de probabilité d'occurrence. Des points de contrôle critiques doivent être appliqués à tous les ingrédients alimentaires, qu'ils soient collectés, transformés, stockés ou préparés à la maison. Le secteur de la recherche agronomique santé doit s'inventer davantage et jouer son rôle vital de santé publique et surtout ne plus dépendre des facteurs économiques. Des problèmes tels que la contamination microbienne doit être contrôlés en mettant en œuvre des approches sectorielles plutôt que des généralisations.

Selon les statistique Canada, le nombre de maladies d'origine alimentaire associées à *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* et *Escherichia coli* est estimé à 630 000 et 100 000, 19 000, 2800, 16 000 et 13 000 cas/an respectivement. Les coûts médicaux, la perte de productivité et les décès dus à une intoxication alimentaire sont estimés à 6,9 milliards de dollars par an aux États-Unis et à 500 millions de dollars par an au Canada. Certaines bactéries pathogènes telles que *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Vibrio* sont économiquement importantes pour les services de santé publique et leur pathogénicité peut provoquer des intoxications alimentaires et la détérioration des aliments.

Les films antimicrobiens biodégradables présentent un intérêt particulier en raison de leur potentiel à retarder la croissance microbienne dans les aliments et à réduire le risque de contamination de surface par des micro-organismes pathogènes. Les films bio-nanocomposite sont considérés comme d'excellents supports pour divers additifs, tels que les antioxydants, les antifongiques et les agents antibactériens. Ces matériaux biodégradables ont donc un effet positif sur l'amélioration et la prolongation de la qualité des aliments dans l'emballage et le stockage des produits ainsi que sur la durée de conservation et sur le fait de minimiser la croissance microbienne du produit.

Dans ce contexte, les films comestibles et biodégradables à base de polysaccharides naturels tel que le chitosane et l'amidon sont utilisés comme emballage alimentaire pour répondre aux préoccupations environnementales tout en prolongeant la durée de conservation des produits alimentaires. Ces emballages comestibles/biodégradables peuvent être consommés avec de la nourriture, fournissant une nutrition supplémentaire. L'utilisation de films comestibles contenant des agents antimicrobiens est un moyen de prévenir la contamination par des agents pathogènes sur les surfaces des aliments.

Introduction générale

En plus d'être biodégradables, le chitosane et ses dérivés ont un large éventail d'activités antibactériennes. Cette propriété offre un potentiel intéressant pour l'utilisation de matériaux à base de chitosane comme agents antimicrobiens pour revêtir différentes surfaces afin de prévenir et/ou d'éliminer les infections microbiennes. Lorsqu'il est dissous dans des solvants faiblement acides, le chitosane possède une densité de charge positive significative due à la protonation de ses groupes amines. Cette caractéristique lui confère un certain nombre de propriétés très intéressantes qui peuvent être appliquées dans divers domaines. Une des caractéristique, les plus développées du chitosane est sa large activité antimicrobienne contre diverses bactéries, levures et moisissures. Cette propriété fait du chitosane un candidat idéal pour le domaine biomédical et même pour l'emballage alimentaire.

Un autre polysaccharide, l'amidon, peut être utilisé dans ce domaine .Il est produit à grande échelle et à faible cout. Les matériaux à base de ce polysaccharide peuvent réduire l'utilisation de ressources non renouvelables. De plus, l'amidon est l'un des bio-polymères naturels les plus abondants.

L'activité antibactérienne des films à base de polysaccharide peut être améliorée par l'incorporation d'agent additif naturel. Dans ce contexte l'utilisation des huiles essentielles comme un agent antibactérien est très importante.

L'objectif de cette étude est de préparer des films composites à partir d'amidon-chitosane, incorporés à l'huile essentielle de cannelle, et d'évaluer leurs propriétés antibactériennes.

Ce mémoire est reparti en 3 chapitres :

Le premier chapitre est consacré à une description générale de l'amidon et du chitosane : composition chimique, structure, propriétés et applications .Enfin un aperçu général sera donné sur les huiles essentielles, avec un regard particulier sur leur activité antibactérienne.

Dans le second chapitre on présentera les réactifs, les produits et le matériel utilisé. La méthode de préparation des films et leurs techniques de caractérisation seront également mises en évidence.

Le dernier chapitre illustre les résultats obtenus, avec leurs interprétations et discussions.

Finalement, nous terminons notre travail par une conclusion générale où nos principaux résultats obtenus lors de cette étude seront présentés.

Chapitre 1
Partie bibliographique

1.1 Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des matières premières intéressantes en raison de leur abondance naturelle. Les polysaccharides utilisés dans les formulations de films sont principalement les mêmes que ceux utilisés comme émulsifiants, épaississants et gélifiants. La séquence principale (unité) des polysaccharides est relativement simple par rapport aux protéines composées de 20 acides aminés. Mais, la conformation structurale des polysaccharides peut être plus complexe et imprévisible que celle des protéines. En plus, ils présentent généralement une masse moléculaire supérieure à celui des protéines. Les films à base de polysaccharides sont typiquement hydrophiles avec de bonnes propriétés de barrière pour l' O_2 et le CO_2 sous certaines conditions ^[1, 2, 3], mais les propriétés barrières à la vapeur d'eau sont limitées. Parmi les polysaccharides filmogènes couramment utilisés, on peut citer l'amidon et ses dérivés, la chitine et le chitosane ^[4].

1.2 L'amidon

L'amidon est une molécule de polysaccharide naturelle, biodégradable, disponible en abondance. Les grains de céréales, comme le maïs, le blé, et les racines, comme la pomme de terre, le tapioca, etc., sont quelques-unes des sources commerciales d'amidon pour l'exploitation industrielle. Il se constitue d'unités de glucose $(C_6H_{10}O_5)_n$ avec "n" allant de 300 à 1000. L'amidon est composé d'un mélange de deux polymères appelés amylose et amylopectine ^[5].

1.2.1 Organisation morphologique des grains d'amidon

L'amidon se présente sous forme de granulés, à l'état natif. Les modifications structurels et les propriétés de l'amidon (taille, formes : sphérique, elliptique, lenticulaire, en l'amylose et l'amylopectine) sont liés aux différentes espèces, aux conditions de croissance, à l'environnement et aux mutations génétiques des plantes ^[6].

La morphologie des granulés d'amidon provenant de certaines sources végétales est illustrée à la figure 1 ci-dessous et montre une variation significative de taille et de forme ^[7].

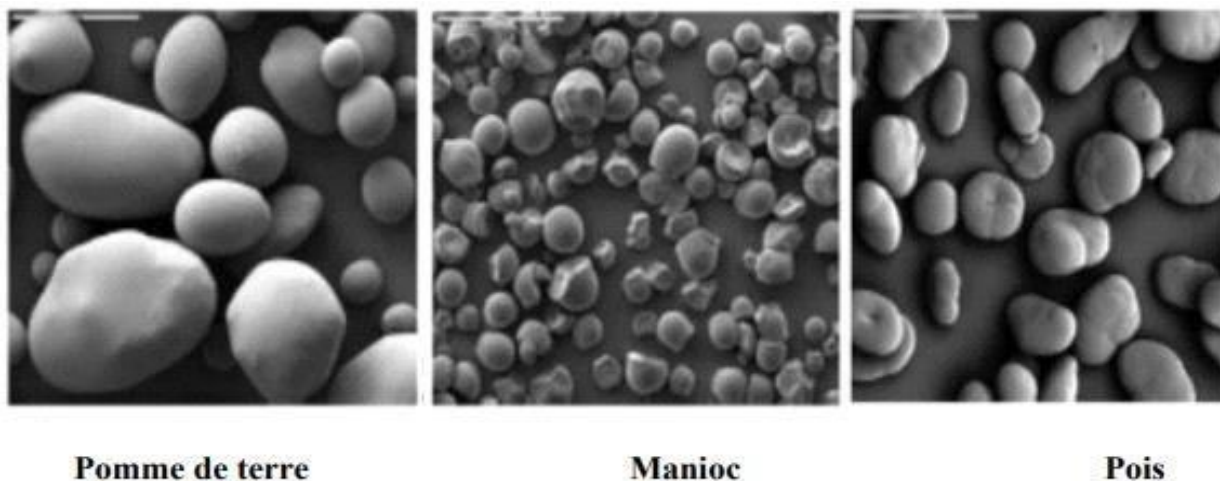


Figure 1 : Grains de différents amidons observés en microscope électronique à balayage (MEB) (Grossissement $\times 280$) ^[7]

1.2.2 La composition moléculaire d'amidon

L'amidon est constitué majoritairement d'une fraction glucidique (98 à 99%) et d'une fraction non glucidique mineure (1 à 2%). Cette dernière, malgré sa présence en faible quantité, ne doit pas être négligée, car elle modifie les propriétés fonctionnelles, en particulier la présence des lipides. L'amidon est un homopolymère d'unité D-glucose, dont la conformation chaise est la plus stable. Les unités D-glucoses sont liées majoritairement (95 à 96 %) par des liaisons de type (1,4) et dans une moindre mesure (4 à 5 %) par des liaisons de type (1,6). Ce dernier est composé de deux polymères de structure primaire différente : l'amylose, molécule essentiellement linéaire et l'amylopectine, molécule ramifiée.

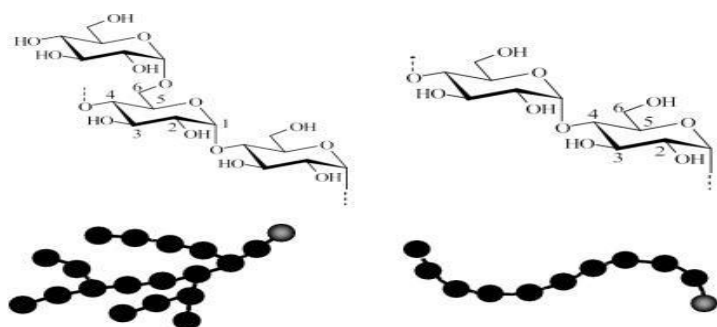


Figure 2: structures de l'amylopectine (à gauche) et de l'amylose (à droite) et représentation schématique du motif de ramification.

1.2.3 Amylose

L'amylose (figure 3) est de 20% à 30% d'amidon, sa source est une macromolécule de nature polysaccharidique, non ramifiée constituée de résidus de D-glucopyranose liés par des liaisons (1-4). Cependant, l'amylose peut contenir 1 % de branches α (1-6). L'amylose a deux fonctions différentes, en position C4 se trouve l'extrémité non réductrice et en position C1 se trouve l'extrémité réductrice qui est due à la fonction hémiacétal de l'alcool terminal ^[8].

L'amylose naturelle contient 500 à 6000 unités de glucose, selon la source végétale, en plusieurs chaînes avec un degré de polymérisation (DP) de l'ordre de 500 ^[9].

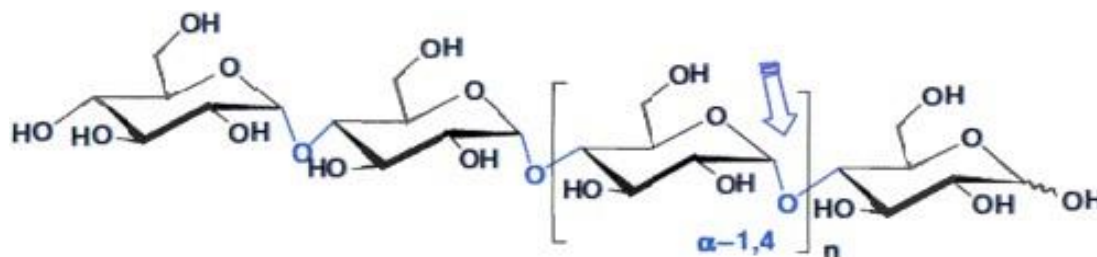


Figure 3: structure d'amylose ^[10].

1.2.4 Amylopectine

L'amylopectine est un polymère composé de molécules de glucose liées en α (1-4), avec des liaisons α (1-6) pour fournir des ramifications toutes les 20 unités de glucose. La masse molaire de l'amylopectine est d'environ 106 à 108 g.mol⁻¹, il y a généralement deux chaînes dans l'amylopectine : chaînes courtes (degré de polymérisation environ 15) et des chaînes plus longues (degré de polymérisation environ 45) ^[10].

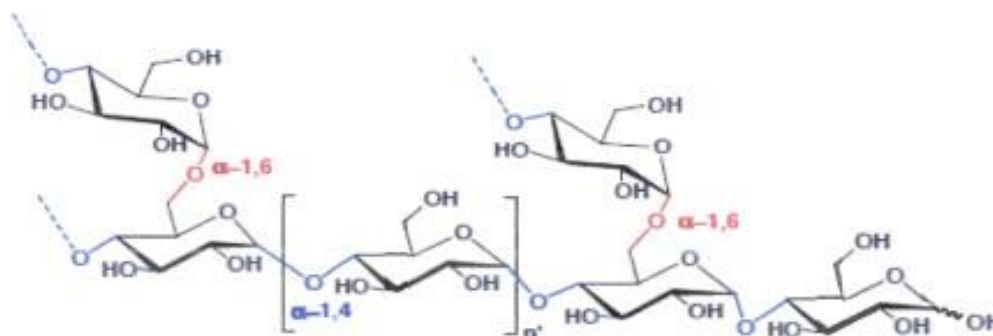


Figure 4: structure d'amylopectine^[10].

1.2.5 Propriétés de l'amidon

1.2.5.1 Hydrothermie

Pour retrouver l'amidon natif dans des applications dans l'industrie on doit utiliser des traitements hydrothermiques ou thermomécaniques pour détruire sa structure granuleuse. A température ambiante l'amidon est insoluble dans l'eau. A des températures plus élevées, les granulés d'amidon subissent différents états caractéristiques. A des températures ambiantes, l'humidité relative de l'air affecte la cristallinité, ce qui indique la perméabilité du grain par rapport à l'eau (phénomène d'adsorption). Le phénomène d'empesage se produit à des températures supérieures à 60°C. Enfin, en retournant à une température ambiante, une gélification de rétrodégradation de l'amidon se produit^[11].

1.2.5.2 Hydrolyse^[12]

L'hydrolyse est le chemin inverse du retour à l'élément de base (le D-Glucose) selon les étapes suivantes. La première étape est la séparation des granules d'amidon ou transformation en farine. La seconde consiste à solubiliser les molécules d'amidon par gélatinisation. La dernière étape implique la dépolymérisation ou l'hydrolyse des chaînes d'amidon. L'hydrolyse de l'amidon peut être réalisée par deux méthodes : hydrolyse chimique et hydrolyse enzymatique.

➤ Hydrolyse chimique :

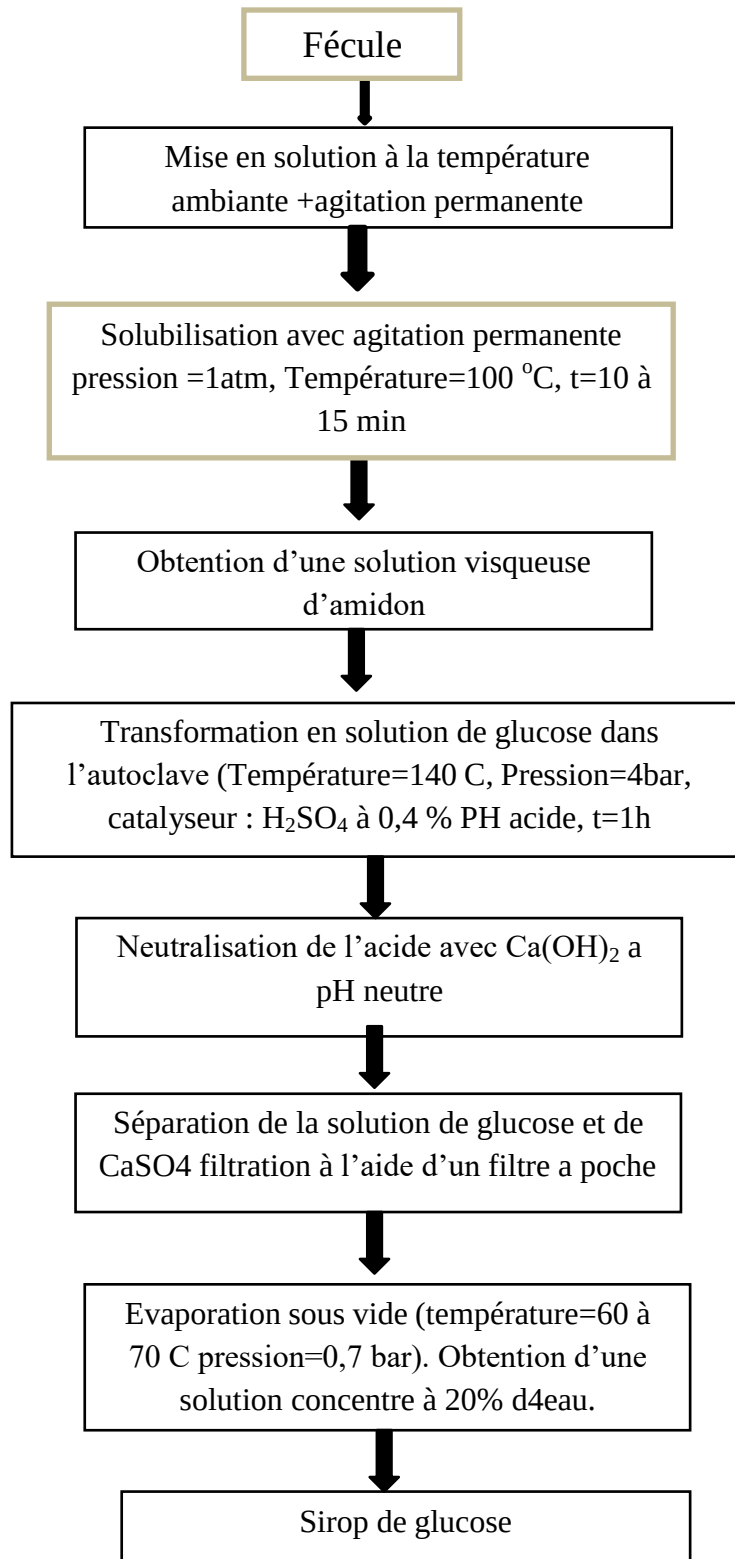


Schéma 1: Diagramme représentatif d'hydrolyse chimique d'amidon.

➤ Hydrolyse enzymatique

L'alpha-amylase agit de manière aléatoire sur les chaînes macromoléculaires et existe chez les animaux et les plantes. La salive humaine est riche en amylase, également sécrétée par le pancréas. La bêta-amylase agit à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne pour décomposer l'amidon en unités de maltose, un disaccharide. Ce processus est également utilisé pour le brassage. gamma-amylase (ou amyloglucosidase ou glucoamylase) crée la dernière liaison alpha-glycosidique à l'extrémité non réductrice et donne le monosaccharide glucose. La gamma-amylase clive également les liaisons alpha 1,6.

1.2.6 Le domaine d'utilisation d'amidon

Les débouchés industriels de l'amidon sont :

- l'agroalimentaire à travers l'industrie des boissons, confiseries et boulangeries^[13].
- l'industrie chimique qui exploite dans les procédés de fermentation pour l'élaboration de bioéthanol, les traitements de surface, la formulation de colles, l'encapsulation de produits pharmaceutiques, les cosmétiques, la papeterie et les matières plastiques biodégradables^[13].
- le compostage industriel^[14].

1.2.7 Principaux acteurs sur le marché

Les principaux fabricants d'amidon sont repris dans le tableau 1^[13].

Tableau 1: Fabricants d'amidon et de produits à base d'amidon

Produit	Société	Marque
Produits à base d'amidon granulaire	Polychim (Italie)	Ecopolym
	Archer Daniels Midland (Etats-Unis)	Polyclean
	Amylum (Italie)	Amyplast
Produits à base d'amidon de pomme de terre	Rodenburg (Pays-Bas)	Solanyl
	Roquette (France)	Cremalys, Pregeflo, Clearam, Nutriose

Produit à base d'amidon déstructuré	National Starch (Etats-Unis)	Ecofram
Produit à base d'amidon thermoplastique	Avebe (Pays-Bas)	Paragon
Bioplastiques à base d'amidon de maïs	Avebe (Pays-Bas)	Mater-Bi

1.3 Chitosane

Le chitosane est un biopolymère semi cristallin non toxique, biocompatible, bioactif et surtout biodégradable obtenu à partir d'un polysaccharide très répandu dans le milieu naturel : la chitine. Cette dernière est en effet considérée comme le polysaccharide le plus abondant après la cellulose avec laquelle elle partage un caractère insoluble. Le faible taux d'acétylation du chitosane lui confère une caractéristique unique dans la grande famille des polysaccharides ^[15].

1.3.1 Source et structure du chitosane

1.3.1.1 Source du chitosane ^[16]

Les déchets de l'industrie des crustacés sont une source très importante de chitine et de chitosane. De nombreuses méthodes ont été développées afin de préparer la chitine à partir des exosquelettes. De manière générale, ces méthodes consistent à éliminer les protéines (déprotéinisation), les éléments minéraux (démminéralisation), la couleur (blanchiment) et les groupements d'acétamides (désacétylation). La méthode standard pour préparer la chitine et le chitosane est expliquée dans la figure suivante.

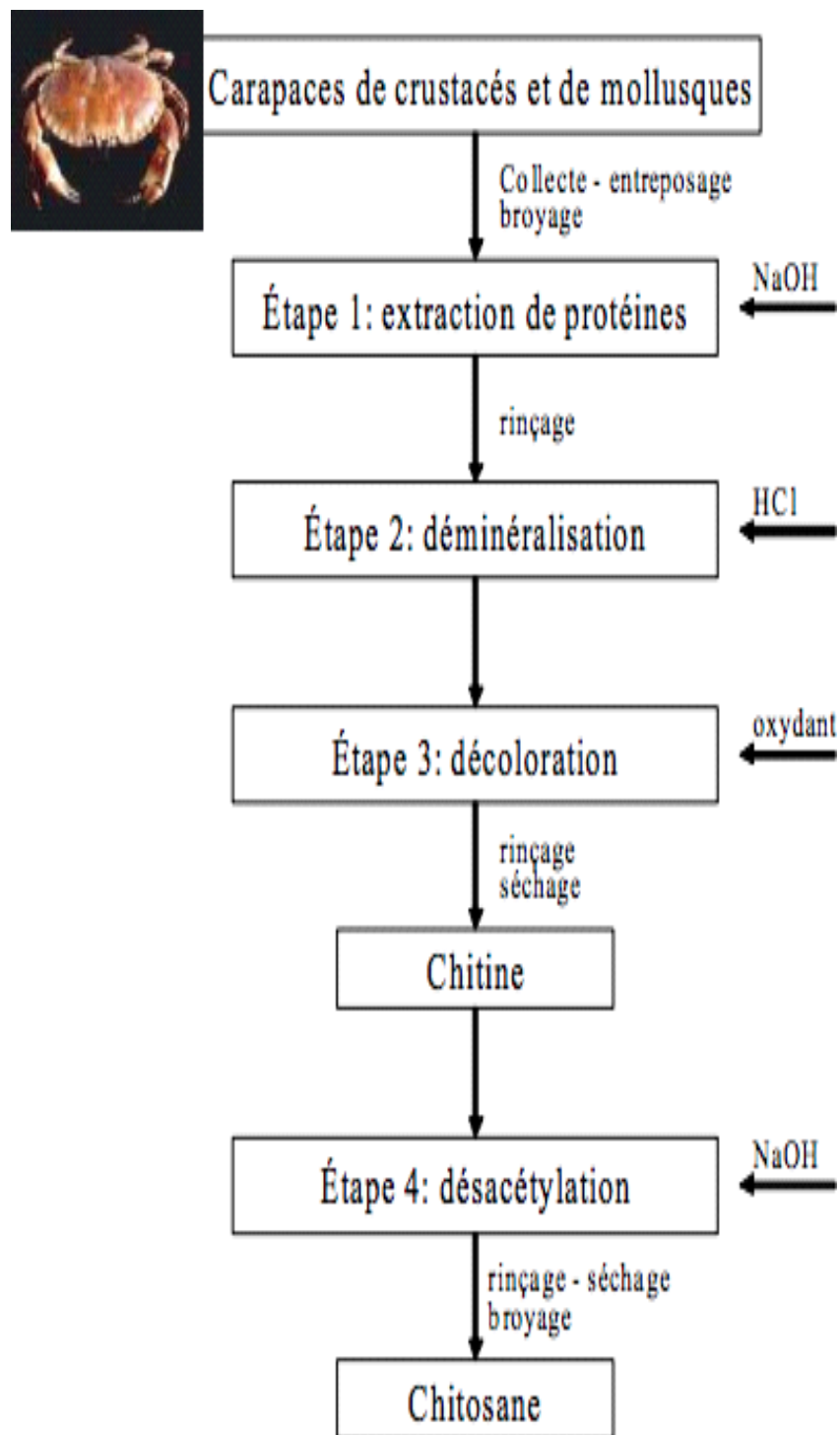


Figure 5: Procédé de la fabrication de la chitine et du chitosane ^[16].

1.3.1.2 Structure du chitosane

La chitine et le chitosane ont une structure chimique pareil, ils sont formés de chaînes linéaires des groupes acétyles glucosamines, la seule différence est dans le nombre de groupements acétyles qui est inférieur pour le chitosane ^[17].

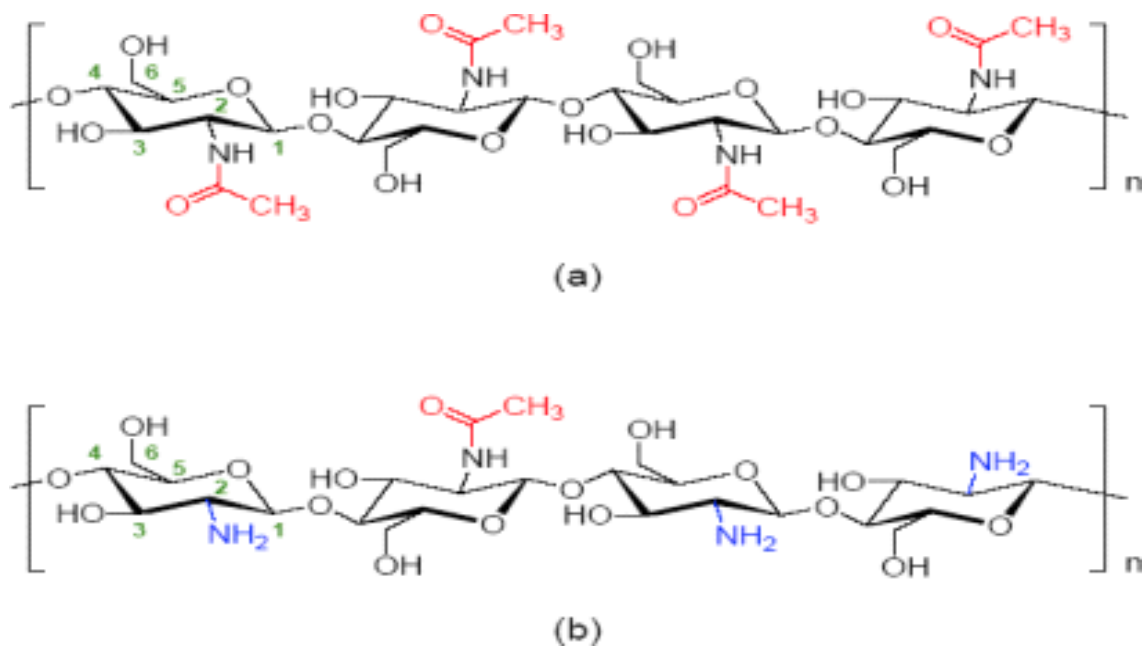


Figure 6: Structure chimique de la chitine (a) et du chitosane (b) ^[17].

1.3.2 Propriétés du chitosane

Suite au procédé de désacétylation, le chitosane devient riche en groupements amines hautement réactifs, ceci fait du degré de désacétylation un paramètre important vu qu'il affecte les propriétés physicochimiques, et donc détermine les applications du chitosane ^[18].

1.3.2.1 Solubilité

Le chitosane peut se solubiliser dans des solutions acides ($\text{pH} < 6,0$ car il a un $\text{pK}_a=6,3$), dans les acides dilués tels que l'acide acétique. Les solutions d'acides concentrées à haute température peuvent le dépolymériser ^[19]. En revanche le chitosane est insoluble dans l'eau, les solvants organiques et les bases aqueuses ^[20]. La solubilité est par contre contrôlée par le degré de désacétylation et il est estimé que le degré de désacétylation soit au moins de 85% pour pouvoir atteindre la solubilité désirée.

Tableau 2: corrélation entre les valeurs DDA et la solubilité du chitosane dans les acides à pH 6 ^[21]

DDA	Solubilité du chitosane
>75	Parfaite
=50	Moyen
<40	Faible

1.3.2.2 Masse moléculaire

Le chitosane commercial a une masse moléculaire variant entre 100.000 et 1.200.000 g/mol ^[22]. En général, à une température élevée, de l'oxygène dissout et sous la contrainte de cisaillement peuvent dégrader le chitosane. Par exemple, au-delà de 280°C, il y a une dégradation thermique du chitosane, les chaînes de polymères se rompent ce qui réduit la masse moléculaire ^[18]. En revanche Les masses moléculaires de chitosane dépendent, du type d'application désirée.

1.3.2.3 Viscosité

La viscosité est une caractéristique importante du chitosane concernant son comportement en solution. Cette caractéristique est liée à la conformation des chaînes macromoléculaires en solution. La viscosité dépend, non seulement du **DDA**, du **MM**, mais aussi du pH car ces paramètres déterminent la densité de charge sur la chaîne de polymère ^[23]. Plus le pH est bas, plus la viscosité est donc forte. La viscosité augmente également avec le DDA car plus le polymère est désacétylé, plus la proportion de groupements amine libres est importante et plus il est soluble. La viscosité augmente également avec la concentration et elle

est fonction de la MM des chaînes macromoléculaires. Comme pour les autres polysaccharides, la viscosité chute lorsque la température augmente ^[23].

1.3.2.4 Flexibilité

Une caractéristique générale des polysaccharides est la flexibilité limitée des chaînes. En raison de l'encombrement stérique des liaisons glycosidiques. Le chitosane est souvent considéré comme un copolymère cationique, linéaire et flexible. La flexibilité diminue avec le DDA. En effet, les chaînes de chitosane dont le DDA est égal à 85 % sont flexibles seulement pour des pH supérieurs à 3 ^[23].

1.3.3 Propriétés antibactériennes du chitosane

Le chitosane est un matériau important dans le domaine de l'emballage alimentaire grâce à ses propriétés antibactériennes, sa biodégradabilité et sa non-toxicité. Des études ont démontré que le chitosane a un effet antibactérien sur plusieurs bactéries, champignons ou levures ^{[24],[25]}. L'activité antibactérienne du chitosane est affectée par plusieurs facteurs : l'aspect microbien (type de bactéries, âge des cellules), le chitosane lui-même (densité de charges positives, le poids moléculaire, le degré de désacétylation, la concentration, le caractère hydrophile ou hydrophobe ou la capacité de former des complexes), l'état physique (film, fibre, sphère ou hydrogel) et les facteurs environnementaux (le pH, la température, le temps ou la présence de cations métalliques) ^[26].

1.3.3.1 Aspects microbiens

Le chitosane n'influe pas de la même façon sur les champignons, les bactéries Gram-positif ou sur les bactéries Gram-négatif. La structure cellulaire de ces deux bactéries est différente. Plusieurs études ont été effectuées à ce sujet sans apporter d'informations précises. Des études ont conclu que l'effet du chitosane est plus important sur les Gram-négatif que sur les Gram-positif ^{[27],[28]}, d'autres ont conclu le contraire ^[29], ou qu'il n'y avait pas de différence entre les deux ^[30].

1.3.3.2 Influence du chitosane

Plus le degré de désacétylation (DDA) du chitosane est élevé plus la densité des charges positives dû au degré de protonation est élevée^[31]. La densité de charge positive élevée confère au chitosane une forte activité antibactérienne^[32]. Une étude a montré que le chitosane avec un DDA élevé, et donc une densité de charges positives élevée, était particulièrement efficace contre les bactéries *Staphylococcus aureus*, suggérant que l'activité antibactérienne augmente avec l'augmentation du DDA du chitosane^[33]. Le masse moléculaire du chitosane a également une influence sur son effet antibactérien. Cependant les résultats des différentes études sont assez contradictoires, certaines montre que l'augmentation du poids moléculaire diminuera l'effet antibactérien du chitosane, d'autres montre le contraire^[34]. Puisque le chitosane est un agent chélateur puissant, ses complexes formés avec des ions métalliques chargés positivement améliorent l'activité antibactérienne^[35]. Un complexe formé avec des ions Ag⁺ augmente jusqu'à 20 fois la capacité antibactérienne du chitosane^[36], et un complexe formé avec des ions Zn²⁺ permet d'augmenter cette dernière jusqu'à 16 fois^[27]. Cette augmentation de l'activité antibactérienne du chitosane dépendra de sa capacité à former des complexes avec les ions métalliques^[37].

1.3.3.3 Etat physique

Une série de réactions entre les molécules de chitosane et la paroi cellulaire des bactéries cause l'activité antibactérienne du chitosane. La forme physique du chitosane aura un impact sur cette série de réactions. À l'état liquide, l'activité antibactérienne du chitosane est affectée par sa solubilité, elle-même dépendante du masse moléculaire, du DDA et du pH^[31]. L'activité antibactérienne du chitosane sera meilleure lorsque sa solubilité est optimisée^[38]. À l'état solide, l'interface entre le chitosane et les bactéries est différente. Elle se situe à la surface des fibres, films, membranes, microsphères, hydrogels ou encore des nanoparticules^[31].

1.3.3.4 Facteurs environnementaux

Le premier facteur environnemental sur l'activité antibactérienne est le pH^[31]. L'efficacité du chitosane pour l'inhibition des bactéries est élevée lorsque le pH est faible^[32]. Le temps est aussi un paramètre à considérer. En effet il a été montré que l'activité antibactérienne de la solution de chitosane après 15 jours de stockage était inférieure à l'activité antibactérienne le jour de dissolution du chitosane^[39]. Enfin, la température joue également un rôle. Le chitosane est plus efficace contre les bactéries à 37 °C qu'à 4 °C^[31]. La

structure cellulaire en surface est modifiée à basse température et le nombre de sites de fixation en surface est réduit ^[40].

1.3.4 Applications

Considérant sa structure chimique et profitant de ses diverses propriétés spécifiques, le chitosane trouve une application importante dans plusieurs domaines alimentaires, cosmétiques et médicaux ^[41].

1.3.4.1 Dans le secteur agroalimentaire

Deux principales applications du chitosane sont exploitées. En premier lieu, de par ses propriétés flocculantes, il permet de séparer les particules colloïdales dispersées dans les résidus des industries de transformation. En second lieu, il est utilisé comme matrice pour l'immobilisation d'enzymes ou de cellules microbiennes, animales et végétales ^[41].

1.3.4.2 Application dans le traitement des eaux

Les potentiels environnementaux du chitosane ont généré un grand nombre la recherche dans le domaine du traitement de l'eau, dans la réduction de la turbidité et dans la stabilisation des hydrocarbures. Le chitosane permet le traitement de l'eau (rinçage ou résidus) chargés en métaux lourds et/ou métaux précieux de provenances diverses, conduisant à une réduction globale des coûts d'exploitation de l'industrie ^[42].

Le tableau suivant résume les différentes applications du chitosane.

Tableau 3: Différentes application du chitosane ^[42].

Domaine d'exploitation	Applications
Alimentaire	Stabilisateur Conservateur
Traitement des eaux	Diminution de la turbidité Diminution de l'odeur
Agriculture	Stimule la croissance des plantes Libérateur de fertilisant et de nutriments
Cosmétique	Traitement de l'acné

Chapitre 1 : Partie bibliographique

	Formulation de shampoing
Biopharmaceutique	Immunostimulant Anticoagulant
Potentiel biomédical	Implant dentaire Reconstitution osseuse Hypocholesteromiant

1.4 Huiles essentielles

1.4.1 Définition

Les HE sont des produits odorants, volatils, produits par le métabolisme secondaire des plantes aromatiques, généralement formées dans des cellules ou des groupes cellulaires spécialisés. Néanmoins, il est encore difficile d'attribuer une définition unique au terme « huile essentielle car il en existe plusieurs types. L'HE est le résultat de la distillation à la vapeur de plantes ou d'arbres aromatiques pour en extraire leur essence. L'HE est donc une essence distillée. Cependant dans la terminologie courante "essence" est souvent utilisé pour parler d'HE. Mais l'inverse du terme peut indiquer que les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues par pressage (tournesol, mais, amande douce, etc.). L'association française de normalisation (AFNOR) définit l'HE comme un produit obtenu à partir de matières végétales, soit par entraînement à la vapeur d'eau, ou par traitement mécanique, à partir de l'écorce des agrumes, soit par distillation sèche. L'HE est ensuite séparée de la phase aqueuse par un procédé physique (AFNOR, 2000). Cette définition est restrictive car elle exclut les produits extraits à l'aide de solvants et les produits obtenus par toute autre méthode ^[43].

1.4.2 Composition chimique d'huile essentielle de cannelle

L'huile de fleur de *cinnamomum zeylanicum* contient de l'acétate de cinnamyle et les feuilles contiennent de l'eugénol. L'écorce et les racines contiennent du cinnamaléhyde et du camphre. L'Huile de cannelle commerciale contient des terpènes hydrocarbonés tels que linalol, carvone, cinnamaléhyde et des composés phénoliques tels que l'eugénol présents dans les aliments. Ce dernier est le principal ingrédient actif dans l'odeur et le goût caractéristique

de cette épice. Ce composé lui confère une bonne activité antibactérienne contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. De plus, il possède de fortes propriétés antifongiques, antimicrobiennes, larvicides et insecticides ^[44].

1.4.3 L'extraction d'huile essentielle de cannelle ^[45]

Les principales méthodes d'extraction d'HE de cannelle sont résumées dans ce schéma :

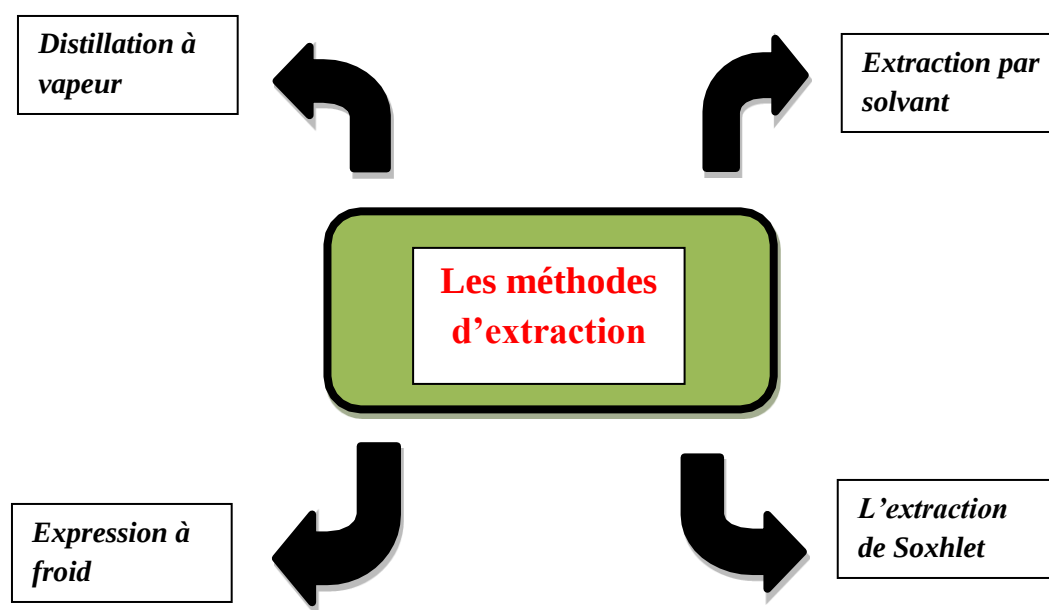


Schéma 2: principales méthodes d'extraction d'HE de cannelle.

1.4.4 Propriétés physicochimiques d'huile essentielle de cannelle

Les propriétés physicochimiques sont résumées dans le tableau suivant ^[46].

Tableau 4: propriétés physicochimiques de l'huile essentielle de cannelle

propriété physicochimique	Valeur
La densité (à 20 °C)	1,061 g / ml
L'indice de réfraction	1,6073
L'activité optique [α]	20 de 12,5° (C = 0,02 g / ml)
L'indice d'acide	14,87 mg de KOH / g d'huile

1.4.5 Effet antibactérien de l'huile essentielle de cannelle

L'huile essentielle de cannelle a une activité antibactérienne contre les bactéries qui causent des maladies infectieuses chez l'homme. L'huile essentielle d'écorce de cannelle obtenue par hydro distillation a montré une excellente activité antibactérienne (exprimée en CMI) (concentration minimale inhibitrice) contre plusieurs souches bactériennes pathogènes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*), et analysée par chromatographie sur couche mince (CCM) et chromatographie en phase gazeuse avec spectrométrie de masse (GC-MS) montrant la présence de *cinnamaldéhyde* ^[47]. Des études supplémentaires ont montré que l'huile essentielle de cannelle est active contre le *Streptococcus mutans* et a conclu que l'utilisation de cannelle est un bon substitut aux autres composés antibactériens responsables des infections buccales. Les auteurs attribuent cette activité antibactérienne à la présence de composés phénoliques tels que le cinnamaldéhyde et l'eugénol, et a conclu que ces extraits de cannelle pourraient être utilisés pour développer de nouvelles formulations pour le traitement de l'acné ^[47]. Il y a une bonne activité antibactérienne de l'huile essentielle d'écorce de cannelle obtenue par distillation à la vapeur contre les bactéries Gram-négatives (*Escherichia*, et *Klebsiella pneumoniae*) a une valeur CMI très faible ^[48]. D'autres études ont montré que le cinnamaldéhyde et l'eugénol présents dans les huiles essentielles de cannelle réduisent la formation de biofilm dans *Escherichia coli* entérohémorragique ^[49].

1.4.6 Application de cannelle dans les industries alimentaires

Les maladies d'origine alimentaire ne se limitent pas aux pays en développement, et les conservateurs qui inhibent la dégradation bactérienne des aliments sont d'une grande importance pour le maintien et l'amélioration de la santé publique. L'activité antibactérienne

Chapitre 1 : Partie bibliographique

de l'huile essentielle de cannelle de Ceylan atteint une autre dimension et apporte un grand espoir à l'industrie alimentaire. L'huile essentielle de cannelle de Ceylan semble être particulièrement efficace contre les champignons tels que *Aspergillus flavus* et *Aspergillus Niger* qui se développent pendant le stockage de nombreuses céréales, telles que le maïs, le riz, les lentilles et les arachides ^[46].

Chapitre 1 : Partie bibliographique

Références bibliographiques:

- [1] Jung H. Han, A.G., Edible films and coatings: a review, in *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Academic Press. p. 239-259, 2005.
- [2] Gontard, S.G.N., Agro-polymers for edible and biodegradable films: review of agricultural polymeric materials, physical and mechanical characteristics, in *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Academic Press. p. 263-275, 2005.
- [3] Krochta, J.M. and De Mulder-Johnston, C., Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*, 51(2): p. 61-74, 1997.
- [4] Colak, B.Y., Utilisation du caséinate de sodium pour la fabrication de films actifs pour l'emballage alimentaire : étude des propriétés barrières aux gaz, de l'activité antimicrobienne et de la biodégradabilité, thèse de doctorat, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, 2014.
- [5] Mikus, P.Y., Etude des relations structure-propriétés de matériaux à base d'amidon : effet d'orientation et d'irradiation sous faisceau d'électrons, thèse de doctorat, université de Reims Champagne – Ardenne, 2011.
- [6] Mitantsoa, J.T., Contribution à la réduction de la pollution de l'environnement émise par les sacs plastiques, élaboration et caractérisation des films bioplastiques à base d'amidon de manioc amer renforcé par le chitosane, mémoire de fin d'étude, université d'Antananarivo, 2019.
- [7] Boursier B., Amidons natifs et amidons modifiés alimentaires. *Technique de l'ingénieur*, F 4 690, 2005.
- [8] Belibi, P.C., Elaboration et caractérisation des biofilms à base d'amidon de manioc renforcés par des charges minérales bi et tridimensionnelles, thèse de doctorat, université de Yaoundé, 2013.
- [9] Banks, W., and Greenwood, C.T: *Starch and its components*. Edinburgh University Press, Edinburgh (England), 1997.
- [10] Larbi, N., Complexes en forme solide des huiles omega-3 avec du carboxyméthyl amidon : poudres et comprimés monolithiques, mémoire, université du Québec à Montréal, 2014.
- [11] Bakouri, H., Modification et étude de propriétés physico-chimiques de l'amidon en présence du liquide ionique [Bmim] Cl en vue de leurs applications biomédicales. Diss. 2021.
- [12] Baoarimandimby, L.V., Transformation en farine, hydrolyse enzymatique de l'amidon et fermentation alcoolique par la levure *Saccharo*, D.E.A. université d'Antananarivo Madagascar, 2004.
- [13] Wertz, J.L., L'amidon et le PLA: deux biopolymères sur le marché. Note de Synthèse, 2011.
- [14] Bendaoud, A., Fluide supercritique et liquide ionique comme plastifiants de polymères biosourcés: application à l'amidon et à l'acétate de cellulose. Diss. Université Jean Monnet-Saint-Etienne, 2014.
- [15] Aljawish, A., Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères, thèse de doctorat, université de Lorraine, 2013.
- [16] Onsøyen, E., and Oyvind S., Metal recovery using chitosan. *Journal of chemical technology and biotechnology* (Oxford, Oxfordshire: 1986) 49.4, 395-404, 1990.

Chapitre 1 : Partie bibliographique

- [17] Nugraha. E., développement de films biodegradables à base chitosane, thèse de doctorat, 2006.
- [18] Rout S. K., Physicochemical, Functional and Spectroscopic analysis of crawfish chitin and chitosan as affected by process modification, diss, Louisiana State university, 2001.
- [19] Roberts, G.A., & Domszy, J.G., Determination of the viscometric constants for chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 4(6), 374-377, 1982.
- [20] Meyers H.K. No, S.P.. Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan-A Review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1995.
- [21] Florea, B. I., Thanou, M., Junginger, H. E., & Borchard, G., Enhancement of bronchial octreotide absorption by chitosan and N-trimethyl chitosan shows linear in vitro/in vivo correlation. *Journal of Controlled Release*, 110(2), 353-361, 2006.
- [22] Li, Q. D., & Dunn, E. T. Grandmaison E.W; Goosen, M.F.A.,. Applications and Properties of Chitosan. *Bioact Compat Polym*, 7, 370-97, 1992.
- [23] Pa, J. H., & Yu, T. L., Light scattering study of chitosan in acetic acid aqueous solutions. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 202(7), 985-991, 2001.
- [24] Allan, C. R., & Hadwiger, L. A., The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental mycology*, 3(3), 285-287, 1979.
- [25] Hirano, S., & Nagao, N., Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural and biological chemistry*, 53(11), 3065-3066, 1989.
- [26] Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J., Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*, 144(1), 51-63, 2010.
- [27] Chung, Y. C., Su, Y. P., Chen, C. C., Jia, G., Wang, H. L., Wu, J. G., & Lin, J. G., Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta pharmacologica sinica*, 25(7), 932-936, 2004.
- [28] No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., & Meyers, S. P., Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International journal of food microbiology*, 74(1-2), 65-72, 2002.
- [29] Zhong, S., Li, H., Bodi, Z., Button, J., Vespa, L., Herzog, M., & Fray, R. G., MTA is an Arabidopsis messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. *The Plant Cell*, 20(5), 1278-1288, 2008.
- [30] Liu, Y. Q., Sun, Z. J., Wang, C., Li, S. J., & Liu, Y. Z., Purification of a novel antibacterial short peptide in earthworm *Eisenia foetida*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 36(4), 297-302, 2004.
- [31] Matet, M., Préparation de films à base de chitosane par voie fondue (Doctoral dissertation, 2014).
- [32] Kong, M., Chen, X. G., Liu, C. S., Liu, C. G., & Meng, X. H., Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(2), 197-202, 2008.

Chapitre 1 : Partie bibliographique

- [33] Takahashi, T., Imai, M., Suzuki, I., & Sawai, J., Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 485-491., 2008.
- [34] Tikhonov, V. E., Stepnova, E. A., Babak, V. G., Yamskov, I. A., Palma-Guerrero, J., Jansson, H. B., ... & Varlamov, V. P., Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-/2 (3)-(dodec-2-enyl) succinoyl/-derivatives. *Carbohydrate polymers*, 64(1), 66-72, 2006.
- [35] Wang, X., Du, Y., Fan, L., Liu, H., & Hu, Y., Chitosan-metal complexes as antimicrobial agent: synthesis, characterization and structure-activity study. *Polymer Bulletin*, 55(1), 105-113, 2005.
- [36] Chen, S., Wu, G., & Zeng, H., Preparation of high antimicrobial activity thiourea chitosan-Ag⁺ complex. *Carbohydrate Polymers*, 60(1), 33-38, 2005.
- [37] Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W., Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465, 2003.
- [38] Xie, Y., Liu, X., & Chen, Q., Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity. *Carbohydrate polymers*, 69(1), 142-147, 2007.
- [39] No, H. K., Kim, S. H., Lee, S. H., Park, N. Y., & Prinyawiwatkul, W., Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time. *Carbohydrate polymers*, 65(2), 174-178, 2006.
- [40] Tsai, G. J., & Su, W. H., Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of food protection*, 62(3), 239-243, 1999.
- [41] Roller, S., & Covill, N., The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International journal of food microbiology*, 47(1-2), 67-77, 1999.
- [42] Rinaudo, M., Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*, 31(7), 603-632., 2006.
- [43] ALLOUN. K., Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Salvia officinalis* L.) et de la rue des montagnes (*Rutamontana* L.). Diss. 2013.
- [44] Oussalah. M., L'effet antimicrobien des films biodégradables à base d'huiles essentielles et le mécanisme d'action de trois huiles essentielles sur des bactéries Gram-positif et Gram-négatif. Diss. Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique, 2005.
- [45] KIOUAS, N., & NAILI, A., Contribution à l'étude de l'influence de la durée de stockage sur quelques caractéristiques physico-chimiques d'une huile essentielle (Doctoral dissertation, جامعة غرداية), 2019.
- [46] Chelaghema. C., et al. Effet de l'ajout de l'huile essentielle de cannelle et du vinaigre sur la qualité de la viande hachée. Diss. Université de Jijel, 2017.

Chapitre 1 : Partie bibliographique

- [47] Chaudhari, L. K., Jawale, B. A., Sharma, S., Sharma, H., Kumar, C. D., & Kulkarni, P. A., Antimicrobial activity of commercially available essential oils against *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract*, 13(1), 71-4, 2012.
- [48] Al-Mariri, A., & Safi, M., In vitro antibacterial activity of several plant extracts and oils against some gram-negative bacteria. *Iranian journal of medical sciences*, 39(1), 36, 2014.
- [49] Nabavi, S. F., Di Lorenzo, A., Izadi, M., Sobarzo-Sánchez, E., Daglia, M., & Nabavi, S. M., Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Nutrients*, 7(9), 7729-7748., 2015.

Chapitre 2

Partie expérimentale

2.1 Introduction

Dans cette partie nous allons discuter les points suivants :

- Matériel et produits.
- Méthode de préparation des films
 - la préparation d'une solution du chitosane.
 - la préparation d'une solution d'amidon.
 - La préparation du mélange (Amidon + Chitosane).
 - Elaboration des films.
- Caractérisation et techniques expérimentales
 - FTIR
 - UV-Visible
 - Microscope optique
- Activité antibactérienne

2.2 Matériel et produits

2.2.1 Matériel

- **Balance analytique** : toutes les pesées ont été réalisées à l'aide d'une balance analytique de marque OHAUS de précision 10^{-4} g.



Figure 7: Balance analytique

- **Bain ultrasons** : marque BRANSON, utilisé pour le dégazer toutes les solutions avant les verser dans des boites de pétris.



Figure 8: Bain ultrasons

- **Etuve sous vide** : marque memmert, utilisé pour le séchage des films.



Figure 9: Etuve sous vide

2.2.2 Produits

Les principaux polymères utilisés dans notre travail sont :

- **Chitosane** en poudre produit par SIGMA-ALDRICH [2-Amino-2-deoxy-(1,4)- β -D-glucopyranan Poly-(1,4- β -D-glucopyranosamine), à partir de la carapace de la crevette, $\geq 75\%$ (déacétylation)] de Lot#061M0046V.

Le tableau suivant présente les principales caractéristiques du chitosane utilisé ^[1].

Tableau 5: principales caractéristiques du chitosane utilis.

Propriété	Spécification
Apparence (couleur, odeur)	Poudre blanche inodore
Chimique	Polymère linéaire, réactivité des groupements amino, réactivité des groupements hydroxyle.
Biologique	Biodégradable, non-toxique
Solubilité	Insoluble au milieu aqueux ou organique

- **Amidon** ($C_6H_{10}O_5$)_n en poudre produit par BIOCHEM Chemopharma .

Le tableau suivant représente les principales caractéristiques de l'amidon ^[2].

Tableau 6: principales caractéristiques de l'amidon.

Apparence (couleur, odeur)	Blanche inodore
Chimique	polymère naturel
Biologique	Comestible
Solubilité	Insoluble dans l'eau à température ambiante

- **L'huile essentielle de cannelle**

Fournisseur : PURIFLORE

Code PHE 14

Origine : Chine

Couleur : jaune à marron rougeâtre

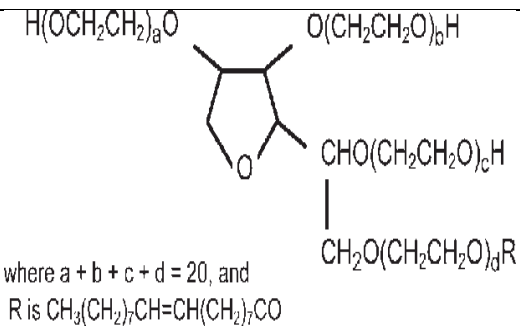
Propriétés: antibactérienne, antifongique, anti-infectieuse et antiparasitaire majeur

- **Tween 80** : (lot#BCBJ8430V).

Le Tween 80, liquide visqueux également connu sous le nom de polysorbate 80, est couramment utilisé comme tensioactif pour disperser les particules hydrophobes dans des solutions aqueuses et comme détergent non ionique pour l'extraction sélective des protéines et l'isolement des noyaux des cellules de mammifères ^[3].

Le tableau suivant représente les principales propriétés de tween 80 ^[3].

Tableau 7: principales propriétés de tween 80.

Propriétés	Caractéristiques
Structure	 where $a + b + c + d = 20$, and R is $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}$
Masse volumique	1,06 g/cm ³
Solubilité	• Dans l'eau : soluble. • Dans huile essentielle : variable.
Poids moléculaire	1310 g/mol
Biologiques	stabilisant et émulsifiant dans les produits cosmétiques, pharmaceutiques et alimentaires.
Chimique	Biodégradable

Chapitre 2 : Partie expérimentale

- **Glycérol**^[4] (1,2,3-propanetriol glycerin ca 87% ; lot# SZBB0800V , Sigma-Aldrich)

Le glycérol est l'un des plastifiants les plus utilisés pour améliorer les propriétés mécaniques des membranes.

Le tableau suivant représente les principales propriétés de glycérol :

Tableau 8: principales propriétés de glycérol.

Propriétés	Caractéristique
Formule brute	$C_3H_5(OH)_3$
Apparence	Liquide inodore incolore et visqueux
Masse molaire	92,09382 g/mol
Masse volumique	1,261 g/cm ⁻³
Densité	1,261
Viscosité	1,5 Pa.S
Point de fusion	18,2 °C
Point d'ébullition	290 °C

2.3 Méthode de préparation des films

2.3.1 Préparation de la solution du chitosane

Une solution de chitosane (2%p/p) est préparée en dissolvant 2g de chitosane en poudre dans 98g de solution d'acide acétique glacial (1% v/v) (1ml d'acide acétique glacial dans 99ml d'eau distillée). Le mélange est mis sous agitation pendant 3h à 50 °C, puis laissé sous agitation pendant 24h.

2.3.2 Préparation de la solution d'amidon

Une solution d'amidon (3,5% p/p) est préparée en dissolvant 3,5g d'amidon dans 96,5g d'eau distillée, le mélange est mis sous agitation à 95 °C pendant 30min, on baisse la température à 40 °C en laissant l'agitation durant 1h. On arrête le chauffage et on laisse le mélange sous agitation pendant toute la nuit.

2.3.3 Préparation du mélange (Ch/Am)

100 g de solution du chitosane avec 100 g de solution d'amidon sont mis dans un bécher sous agitation modérée. 1,65g de glycérol (30% des solides) est ensuite ajouté sous agitation.

Chapitre 2 : Partie expérimentale

Enfin l'huile essentielle de cannelle(1%, 1,5%,2% par rapport au mélange), précédemment mélangée au tween 80 (0,25g/g d'huile essentielle), est incorporée dans la solution(Ch/Am)

La composition de quatre formulations préparées B1 à B4 est représenté dans le tableau suivant :

Tableau 9: composition de quatre formulations préparées B1 à B4.

Expérience	Quantité solution Ch/Am (g)	Quantité HEC %
B1	15	0
B2	15	1
B3	15	1.5
B4	15	2

Chaque mélange préparé est homogénéisé à 3000rpm pendant 3min et dégazé pendant 30min. Finalement la solution filmogène est coulée dans des boîtes de pétri de 9cm de diamètre et séchée pendant 24h à température ambiante, puis mise dans une étuve sous vide à 40 C pendant 24h.

2.4 Méthodes de caractérisation

2.4.1 Spectrophotométrie FTIR (ATR)

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Les analyses sont réalisées au laboratoire de recherche sur les macromolécules et leurs applications « LRM » de TLEMCEN. Elle permet d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans la molécule étudiée par la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques. L'analyse se fait à l'aide d'un spectromètre

Chapitre 2 : Partie expérimentale

à Transformée de Fourier qui envoie un rayonnement infrarouge sur notre échantillon et mesure les longueurs d'ondes absorbées par la molécule et les intensités de l'absorption ^[5]. L'appareil utilisé est un spectromètre Agilent Cary FTIR Série 600.

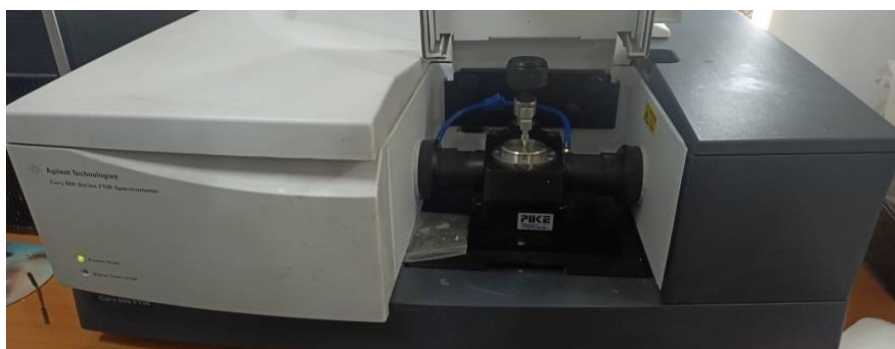


Figure 10: Spectromètre FTIR.

2.4.2 Spectrophotométrie Uv-vis

La spectroscopie ultraviolet-visible est une méthode de spectroscopie photonique dont les longueurs d'onde se situent dans le domaine UV lointain (10-200 nm), proche UV (200-400 nm) et visible (400-800 nm). Cette spectroscopie fait partie des méthodes de spectroscopie électronique. Elle est basée sur la propriété des molécules à absorber le rayonnement lumineux d'une certaine longueur d'onde. Dans une molécule, les transitions électroniques ont lieu dans les domaines de l'ultraviolet et du visible. La spectroscopie UV-visible est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre. Lorsque la cuve contenant la solution est placée sur le spectrophotomètre, il reçoit un rayonnement d'une intensité de $15 I_0$. Une partie de cette lumière incidente, étiquetée I_0 , est absorbée par le milieu, et le reste, étiqueté I , est transmis. L'intensité (I) du rayonnement du réservoir est donc inférieure à l'intensité du rayonnement initial (I_0) ^[6].



Figure 11: Spectromètre Uv-visible.

Cette technique a été utilisée pour mesurer la transparence des films et leur opacité.

Cette dernière est donnée par la loi :

$$\text{Opacité} = \frac{\text{Abs } 600}{Y}$$

Y : l'épaisseur du film (mm)

2.4.3 Microscopie optique MOP

L'étude morphologique des films a été examinée par microscopie optique. Elle permet de visualiser l'homogénéité de la surface de ces films avant et après l'incorporation de l'huile essentielle à différentes concentrations. Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique Olympus équipé d'une caméra numérique permettant l'acquisition des images obtenues ^[7].



Figure 12: Microscope optique.

2.4.4 Épaisseur du film

L'épaisseur du film a été mesurée à l'aide d'un micromètre électronique de sensibilité 0,001mm. Quatre mesures d'épaisseur ont été prises pour chaque échantillon dans différentes zones du film. La valeur utilisée pour déterminer l'épaisseur du film est la moyenne de ces mesures ^[7].



Figure 13: Micromètre électronique.

2.5 L'activité antibactérienne

Le but de ce test est d'étudier l'effet d'incorporation de l'HE de cannelle sur les propriétés antibactériennes des films Ch/Am et évaluer ce potentiel par rapport à 3 bactéries.

2.5.1 Matériaux utilisés

2.5.1.1 Origine et choix des bactéries

Nous avons choisis les bactéries suivantes à cause de leur implication dans les contaminations et l'infection alimentaire rencontre dans le domaine médical.

- ❖ Bactéries : Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC : 25923) ; Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC : 25922 ; *Klebsiella pneumoniae* ATCC : 13883)

2.5.1.2 Milieu de culture

- ❖ **Gélose de Hektoen**

Le milieu de culture Hektoen est milieu d'isolement sélectif des bactéries à Gram négatif.

- ❖ **Gélose de Chapman**

Le milieu de culture Chapman est un milieu de sélectif semi synthétique utilisé pour la sélection des bactéries halophiles. Il est utilisé particulièrement pour l'isolement des *Staphylococcus*.

2.5.2 Protocol expérimental

2.5.2.1 Méthode de diffusion sur disque

Le principe de cette méthode est basé sur la diffusion du composé antibactérien dans un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de pétri. L'effet du produit antibactérien sur le microorganisme ciblé est évalué par la mesure d'une zone d'inhibition. Cette méthode permet de qualifier la sensibilité ou la résistance de ces bactéries par rapport à l'huile essentielle de cannelle.

25 ml de milieu de culture gélosé sont coulés aseptiquement dans une boîte de pétri. Après solidification du milieu de culture, un volume de 100 µl de suspension microbienne à tester est

Chapitre 2 : Partie expérimentale

étalé sur toute la surface de la gélose, afin d'obtenir la quantité la plus homogène de bactéries en surface. On laisse sécher de 10 à 15 minutes.

On prélève les 3 disques/boîte et on les dépose dans la boîte, à l'aide d'une pince stérile, ensuite trempé par 10µl de solution (Ch/Am/HEC) dans chaque disque. Les boîtes de pétris sont fermées et laissées diffuser pendant 15min puis mises dans l'étuve pendant 24h.

➤ Expression des résultats

Ces résultats sont lus par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition. Les zones doivent être uniformément circulaire^[8]. Les zone d'inhibition qui exprime l'activité antimicrobienne sont comme suite^[9] :

- Diamètre supérieur à 15 mm: activité antibactérienne forte,
- Diamètre de 12 à 15 mm : activités antibactérienne élevée,
- Diamètre de 10 à 11,9 mm : activité antibactérienne modeste,
- Diamètre de 7 à 9,9 mm : activité antibactérienne faible,
- Diamètre inférieur à 7 mm : activité antibactérienne nulle.

Références bibliographiques :

- [1] Laplante, S., Étude des propriétés stabilisantes d'émulsion du chitosane en présence d'isolat de protéines de lactosérum. Université Laval, 2004.
- [2] N'gg, A., Tetchi, F. A., & Coulibaly, A., Propriétés physico-chimiques de l'amidon de gingembre (*Zingiber officinale roscoe*) de Côte d'Ivoire. *Tropicultura*, 22(2), 77-83, 2004.
- [3] Yasser, B. A., Contribution à l'étude des effets antifongiques de deux solvants (DMSO et Tween 80) sur *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus niger*.2021.
- [4] Pagliaro ,M., properties , glycerol , applications , history and market .glycerol : 1-21 ,2017.
- [5] Dospinescu-Rosu, A. M., Synthèse et étude d'amidons modifiés pour le développement de procédés d'oxydation du benzo [a] pyrène, un modèle de polluant organique persistant (Doctoral dissertation, Université du Littoral Côte d'Opale; Universitatea Vasile Alecsandri din Bacău (România)).2011.
- [6] Benbayer, C., Caractérisation des polymères, université d'Oran , 2021.
- [7] Hammoudi, N., Elaboration et caractérisation de films antimicrobiens nano-composites alginate/montmorillonite/huile essentielle de citron, thèse de doctorat de l'université Abou-BekrBelkaid, 2021.
- [8] Schwalbe, R., Steele-Moore, L., & Goodwin, A. C., Antimicrobial susceptibility testing protocols. Crc Press, 2007.
- [9] ChikhI, I., composition chimique et activites biologiques des extraits de cinq plantes aromatiques et medicinales de l'ouest d'Algérie, thèse de doctorat de l'université de Abou-BekrBelkaid Tlemcen, 2014.

Chapitre 3

Résultats et discussion

3.1 Aspect des membranes

Les matériaux élaborés se présentent macroscopiquement sous forme de films lisses et homogènes. Les membranes de (Ch/Am/HEC) sont souples, flexibles de couleur jaunâtre très claire.

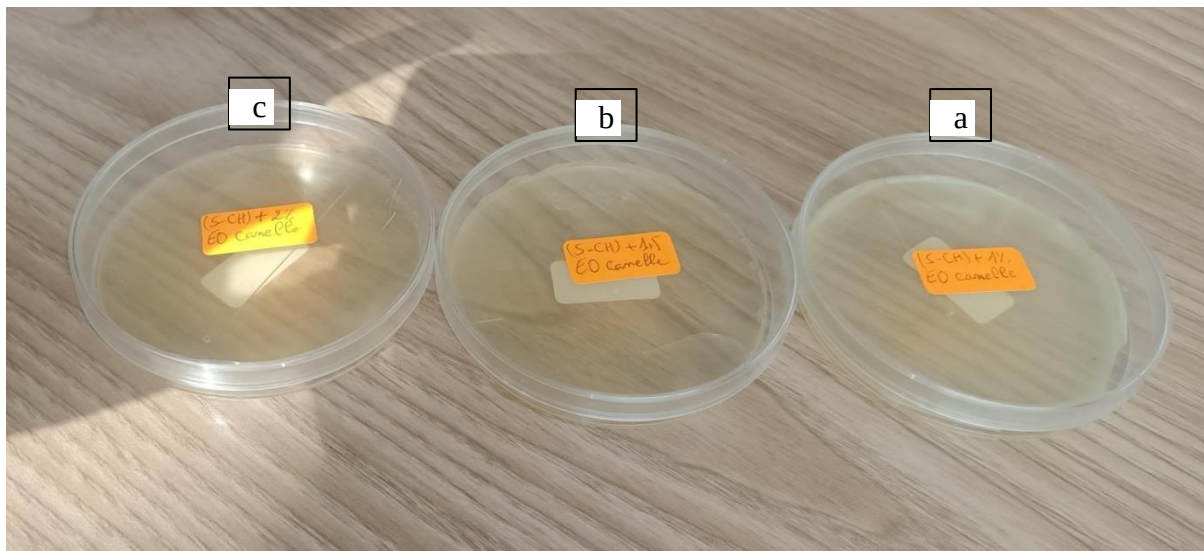
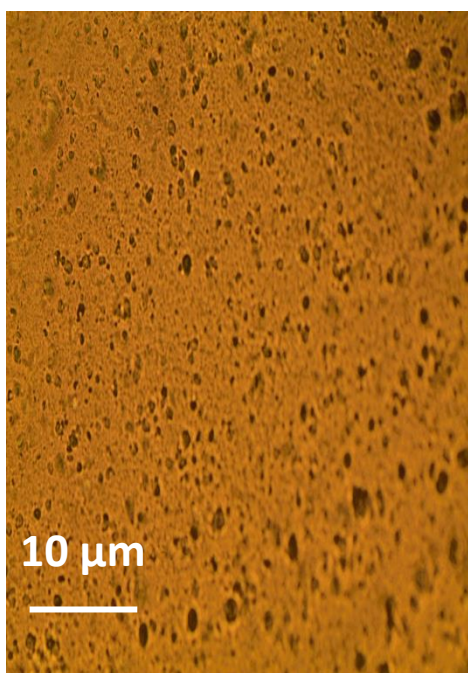
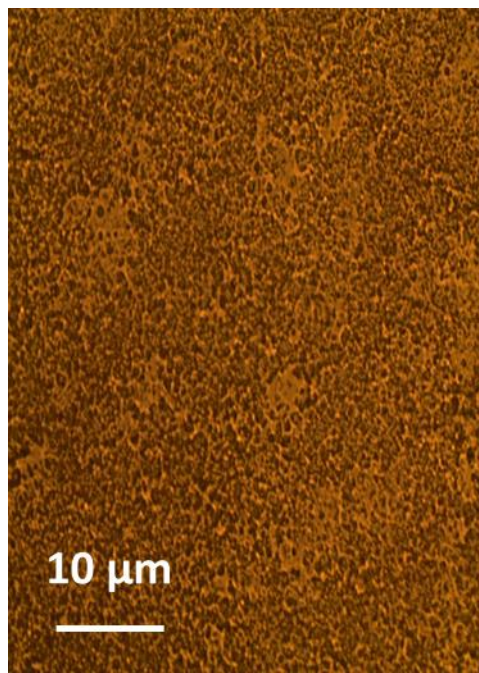


Figure 14: a) membrane (Ch/Am/1% HEC), b) membrane (Ch/Am/1,5% HEC), c) membrane (Ch/Am/2% HEC)

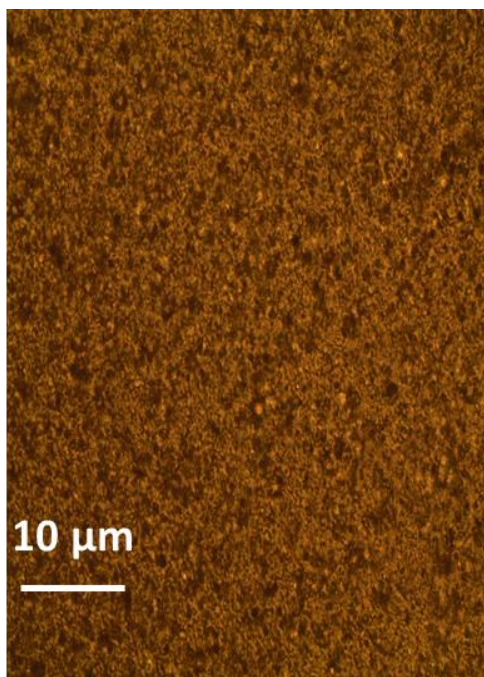
La qualité de la surface des films a été analysée par la microscopie optique et la dispersion des différentes concentrations d'huile essentielle (1%, 1,5% et 2%) dans les membranes est présentée sur la figure 15 (1),(2),(3) et (4), les gouttelettes d'HEC sont dispersées uniformément sur la surface du film et ne présente pas d'agglomération significative. Cette observation nous amènerait à conclure à la bonne miscibilité de HEC dans la matrice.



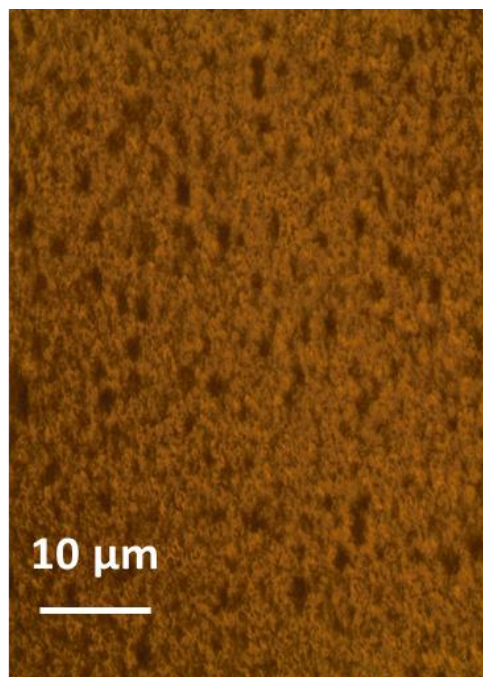
(1) : témoin (Am/Ch)



(2) : (Am/Ch/1%Cannelle)



(3) : (Am/Ch/1,5%cannelle)



(4) : (Am/Ch/2%cannelle)

Figure 15: Morphologie des membranes (1),(2),(3)et(4).

3.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La figure 16, illustre les résultats de l'analyse qualitative par FTIR du film témoin (Am/Ch) et du film (Am/Ch/1%cannelle).

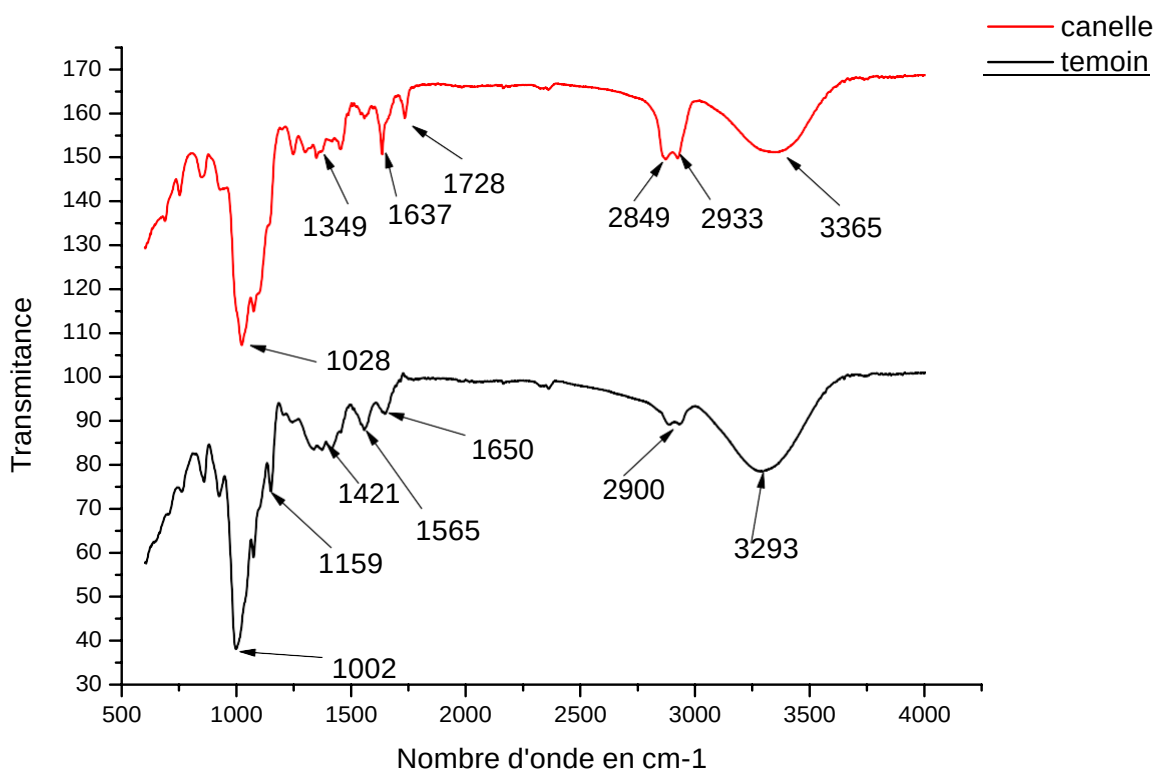


Figure 16: Spectre IR du film témoin (Am/Ch) et du film (Am/Ch/1%cannelle).

La figure 16, présente les spectres FTIR des films Ch/Am (témoin) et (Ch/Am/1% cannelle).

Comme la montre la figure 16, le spectre de film témoin présente un pic à 1002 cm⁻¹ attribué au CO des alcools primaires. Un pic à 1159 cm⁻¹ attribué au CN. Le pic à 1421 cm⁻¹ correspond à la déformation des groupes CH₃ et le faible pic à 1565 cm⁻¹ provient des groupes NH des amines primaires. Les pics à 1650, 2900 et 3293 cm⁻¹ correspondent respectivement au groupe CO des amides, des CH hybridé sp³ et les élongations des groupes NH et OH.

Dans le cas de spectre de (Ch/Am/1%cannelle), un pic à 1028 cm⁻¹ représente l'élongation des groupes CO des alcools primaires. Un pic 1349 cm⁻¹ attribué à la déformation des groupes CH₃ et à 1637 cm⁻¹ un pic qui correspond au CO des amides.

Chapitre 3 Résultats et discussion

Les pics 1728, 2849, 2933 et 3365 présentent respectivement l'élongation des groupes C=C de type benzylique, l'élongation des groupes CH, les CH hybridé en sp^3 et l'élongation des groupe NH et OH.

En comparant les 2 spectres IR des films Ch/Am et Ch/Am/1%de cannelle nous constatons qu'il y a des interactions entre les groupes de Ch/Am et ceux de l'huile essentielle de cannelle, par exemple il y a disparition des pics 1159 et 1565 cm^{-1} , un déplacement des pics 1002 à 1028 ; 1421 à 1349 ; 1650 à 1637 ; 2900 à 2933 et 3293 à 3365 cm^{-1} , et l'apparition de nouveaux pics qui correspondent à l'huile essentielle de cannelle comme 1728 cm^{-1} et 2849 cm^{-1} .

Les 3 spectres de FTIR pour les différentes concentrations d'HE de cannelle (1 ; 1,5 et 2%) sont similaires.

3.3 Epaisseur et valeurs d'opacité des films

Les films obtenus sont épais, et deviennent de plus en plus opaque quand on ajoute de l'huile essentielle.

Le tableau suivant résume les épaisseurs, l'absorbance à 600nm et les valeurs d'opacité.

Tableau 10: les épaisseurs, l'absorbance à 600 et l'opacité.

Film	Epaisseur (mm)	Absorbance	Opacité
Témoin	0,0600	0,0475	1,26
1% cannelle	0,3990	0,1217	3,28
1,5% cannelle	0,5489	0,157	3,50
2% cannelle	0,5492	0,200	2,75

Nos films sont souples et flexibles .ils deviennent plus épais avec l'ajout de l'HEC, on pense que les constituants de l'huile essentielle, de faible masse moléculaire, s'intègrent dans les chaine des polymères chitosane et amidon, ce qui conduit à une épaisseur croissante du film.

La valeur de l'opacité du film témoin calculer est de 1,26, alors que lors de l'ajout de HE l'opacité augmente jusqu'à 3,5. On conclue que les films sans HE sont plus transparents que leur homologue avec HE.

3.4 Spectrophotométrie UV-visible

La transmittance de la lumière UV-visible des films Ch/Am contenant diverse concentrations de l'huile essentielle de cannelle dans l'intervalle de longueur 375-800 nm est illustré dans la figure 17.

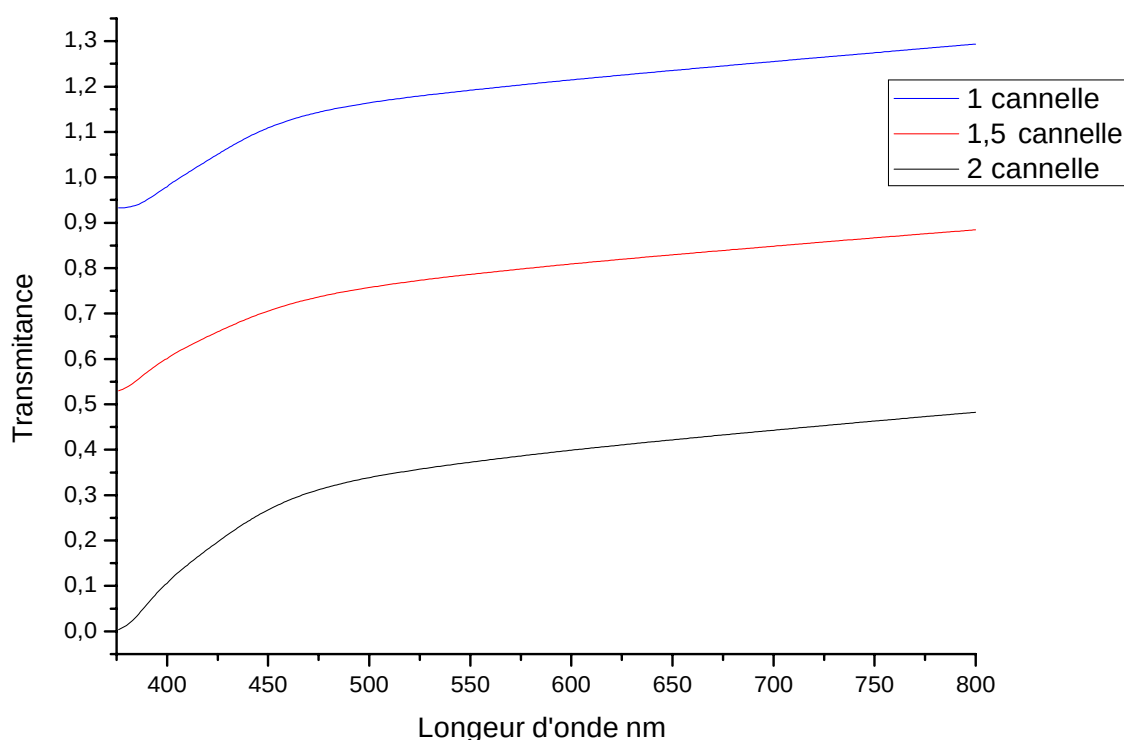


Figure 17: Spectres UV-visible des films à base de mélange Ch/Am/HEC avec des différentes concentrations (1%, 1,5%, 2%).

Les films contenant de l'HE sont capable d'arrêter le rayonnement ultraviolet dans la région de 200-375 nm. Une diminution de la transmittance de 1% à 2% de l'huile essentielle de cannelle est probablement due à la diffusion de la lumière à la surface des gouttelettes de l'huile essentielle dans la matrice du film.

3.5 Activité antibactérienne

On a utilisé la méthode de diffusion des disques qui nous permet de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des différents films avec des différentes concentrations d'HE de cannelle dans la membrane vis-à-vis de 3 bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*).

Les résultats antibactériens des films montrent qu'il n'y a aucune activité antibactérienne dans les 4 films (0% ; 1% ; 1,5% et 2% de HEC) et avec les 3 bactéries, dans les figures 18, 19 et 20.

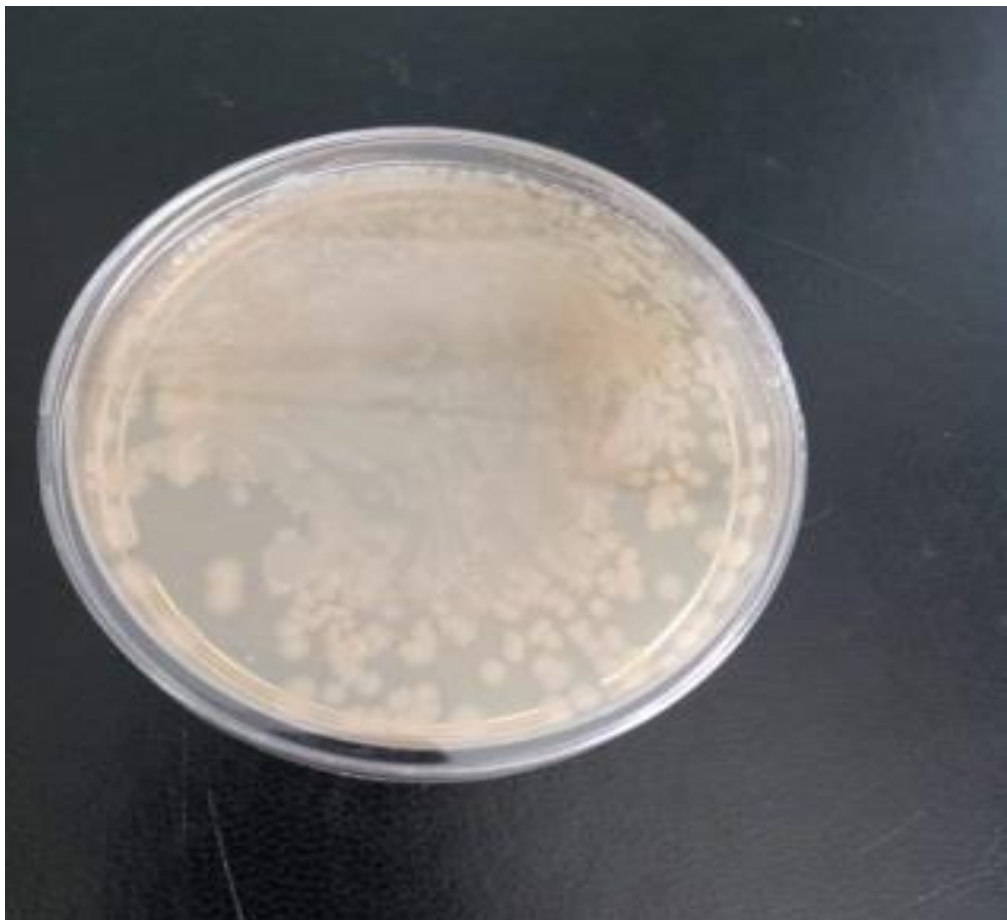


Figure 18: Activité antibactérienne des films de Ch/Am/HE de cannelle *Staphylococcus aureus*



Figure 19: Activité antibactérienne des films de Ch/Am/HE de cannelle *Escherichia coli*

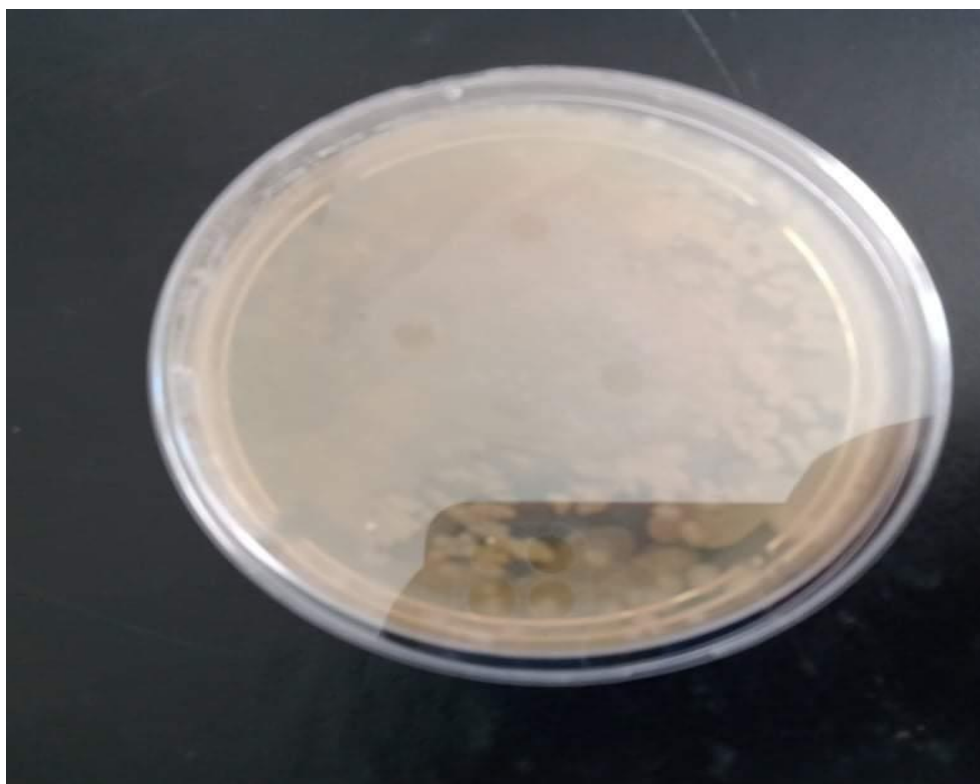


Figure 20: Activité antibactérienne des films de Ch/Am/HE de cannelle *klebsiellapneumonea*

Chapitre 3 Résultats et discussion

L'objectif principal de cette étude était de tester l'activité antibactérienne des films à base de chitosane/amidon et l'huile essentielle de cannelle.

Les résultats ont montré que les bactéries choisies ne sont pas sensibles aux films préparés. En effet ces matériaux n'ont présenté aucune activité antibactérienne.

Il est bien connu dans la littérature que l'huile essentielle de cannelle possède des propriétés antimicrobiennes (voir partie bibliographique). La seule explication plausible, à notre avis, de nos résultats est la très faible ou l'absence d'incorporation de l'huile essentielle de cannelle dans la matrice chitosane/amidon.

Cela pourrait être dû à deux paramètres :

- a) Le rapport de la quantité de tween 80/HEC. En effet d'après la littérature à chaque huile essentielle correspond un rapport tween 80/HEC.
- b) Le rapport chitosane/amidon pourrait peut-être avoir une influence sur l'incorporation de l'huile dans la matrice.

Conclusion Générale

Le but de notre travail était d'élaborer des matériaux, possédant une activité antibactérienne, à base des polysaccharides et d'additifs naturels.

Pour arriver à cette fin, nous avons élaborés développé des films à base du chitosane et d'amidon et dans lesquels est incorporée l'huile essentielle de cannelle, connue pour ses propriétés antibactériennes et antifongiques.

Les matériaux développés se présentent macroscopiquement sous forme de films lisses, souples et flexibles. La microscopie optique montre une bonne dispersion de l'huile essentielle de cannelle sur la surface des films. En effet les gouttelettes huileuses sont réparties uniformément et ne présentent pas d'agglomération significative. Cette observation nous amènerait à conclure à la bonne miscibilité de l'huile essentielle dans la matrice.

L'analyse par spectrophotométrie infrarouge transformée de Fourier montre la présence des pics caractéristiques des différents constituants des films (amidon, chitosane et l'huile essentielle de cannelle). Les spectres FTIR montrent également qu'il y a effectivement interaction entre chitosane/amidon et l'huile essentielle de cannelle.

Les résultats des mesures de la spectrophotométrie Uv-visible montrent que l'opacité augmente avec la concentration de l'huile essentielle. L'effet de cette dernière sur la transparence des films peut être lié à sa coloration.

Les trois films élaborés contenant l'huile essentielle de cannelle sont capables d'arrêter le rayonnement ultraviolet dans la région de 200-375 nm. Ils possèdent donc des propriétés barrières contre les radiations Uv et peuvent par conséquent retarder l'oxydation par la lumière des lipides présents dans les aliments.

L'objectif principal de cette étude était de tester l'activité antibactérienne des films à base de chitosane/amidon et l'huile essentielle de cannelle.

Les résultats ont montré que les bactéries choisies ne sont pas sensibles aux films préparés. En effet ces matériaux n'ont présenté aucune activité antibactérienne.

Il est bien connu dans la littérature que l'huile essentielle de cannelle possède des propriétés antimicrobiennes (voir partie bibliographique). La seule explication plausible, à notre avis, de nos résultats est la très faible ou l'absence d'incorporation de l'huile essentielle de cannelle dans la matrice chitosane/amidon.

Cela pourrait être dû à deux paramètres :

1. Le rapport de la quantité de tween 80/HEC. En effet d'après la littérature à chaque huile essentielle correspond un rapport tween 80/HEC.
2. Le rapport chitosane/amidon pourrait peut-être avoir une influence sur l'incorporation de l'huile dans la matrice.

Ces deux facteurs pourraient faire l'objet d'une étude à part.

Comme autres perspectives nous envisageons, d'étudier d'autres caractéristiques de nos films telles que : les propriétés mécaniques (viscosité, rhéologie,...), les propriétés thermique (ATG, DSC,...), la caractérisation peut être complétée par microscopie électronique à transmission. Cette technique offre une résolution jusqu'à 0,2nm. Une étude qui permettrait l'amélioration de la résistance à l'eau et la perméabilité à la vapeur d'eau est très importante notamment dans les applications des films pour les emballages alimentaires.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم الخواص المضادة للبكتيريا لألغشية المركبة من النشاء والستينوزان المدمجة بزيت الزرقة الأساسي بتركيزات مختلفة (1% ، 1.5% ، 2%). تم دراسة العالم المحضرة بعدة طرق و هي : الشعرة تحت الحمراء ، الفحص المجهرى البصري و الشعرة نوك البينسجية المجهرية. تولد النتائج وجود تفاعل بين زيت الزرقة الأساسي وخليط الستينوزان / النشاء. درست البنية والخصائص البصرية بالمجهر الضوئي والقياس الطيفي الحراري للشعرة نوك البينسجية.

تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لألغشية بطريقة انتشار الرصاص.

أظهرت النتائج أن البكتيريا المختارة ليست حساسة لألغشية المحضرة. و بالتدريج لم تظهر هذه المواد أي نشاط مضاد للجراثيم والسبب لم يتضح بعد، حيث أن زيت الزرقة الأساسي معروف بخصائصه المضادة للميكروبات.

يُذكر بأن هذا سبب

1- نسبة كمية نوك 80 / زيت الزرقة الأساسي . في الواقع، ونذكر أن للديابات ، كل زيت أساسي يتوافق مع نسبة 80 / زيت أساسي.

2- يُذكر بأن نسبة الستينوزان / النشاء تؤثر على دمج الزيت في القلب.

العلامات الملاحظة: الستينوزان ، النشاء ، زيت الزرقة الخطري ، نشاط مضاد للبكتيريا ، غشاء مضاد للبكتيريا

Résumé

Le but de cette étude est d'évaluer les propriétés antibactériennes de films à base d'amidon et de chitosane dans lesquels est incorporée l'huile essentielle de cannelle à différentes concentrations (1% ; 1,5% ; 2%). Les films préparés ont été caractérisés par FTIR, microscopie optique et Uv-visible. Les résultats confirment l'interaction entre l'huile essentielle de cannelle et le mélange chitosane/amidon. La structure et les propriétés optiques ont été caractérisées par microscopie optique et par spectrophotométrie Uv-visible.

L'activité antibactérienne des films a été évaluée par la méthode de diffusion en disque.

Les résultats ont montré que les bactéries choisies ne sont pas sensibles aux films préparés. En effet ces matériaux n'ont présenté aucune activité antibactérienne.. La cause n'est pas encore claire, car l'huile essentielle de cannelle est bien connue pour ses propriétés antimicrobiennes.

Cela pourrait être dû à deux paramètres :

1. Le rapport de la quantité de tween 80/HEC. En effet d'après la littérature à chaque huile essentielle correspond un rapport tween 80/HEC.
2. Le rapport chitosane/amidon pourrait peut-être avoir une influence sur l'incorporation de l'huile dans la matrice.

Mots clés : Chitosane, amidon, huile essentielle de cannelle, activité antibactérienne, film antibactérien.

Summary

The aim of this study is to evaluate the antibacterial properties of films based on starch and chitosan in which cinnamon essential oil is incorporated at different concentrations (1%; 1.5%; 2%). The prepared films were characterized by FTIR, optical microscopy and UV-visible. The results confirm the interaction between the essential oil of cinnamon and the chitosan/starch mixture. The structure and the optical properties were characterized by optical microscopy and UV-visible spectrophotometry. The antibacterial activity of the films was evaluated by the disc diffusion method. The results showed that the selected bacteria are not sensitive to the prepared films. Indeed these materials did not show any antibacterial activity. The cause is not yet clear, as cinnamon essential oil is well known for its antimicrobial properties.

This could be due to two parameters:

1. The ratio of the amount of tween 80/HEC. Indeed, according to the literature, each essential oil corresponds to a tween 80/CET ratio.
2. The chitosan/starch ratio could perhaps have an influence on the incorporation of oil into the matrix.

Key words: Chitosan, starch, cinnamon essential oil, antibacterial activity, antibacterial film.