

THÈSE

EN CONTUTELLE

Entre

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR

Et

**L'UNIVERSITÉ HASSAN II - AIN CHOCK
MAROC**

PRESENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

Par

Rachid BELALIA

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

Spécialité : SCIENCES DU BOIS

**SYNTHESE D'UN BIOCIDES PAR MODIFICATION CHIMIQUE DE
CHITOSANE :
PRESERVATION DU BOIS
PRESERVATION DES ALIMENTS**

Soutenue le 28 mars 2006

Après avis de :

M M :	P. Gérardin	Professeur, Université Henri Poincaré Nancy I/France	Rapporteur
	S. Sebti	Professeur, Université Hassan II-Mohammedia/Maroc	Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

M M :	A. Castellan	Professeur, Université Bordeaux I/France	Président
	P. Gérardin	Professeur, Université Henri Poincaré Nancy I /France	Rapporteur
	S. Sebti	Professeur, Université Hassan II-Mohammedia /Maroc	Rapporteur
	M. Benaissa	Professeur, Université Hassan II-Ain Chock /Maroc	Examineur
	A. El Amrani	Professeur, Université Hassan II-Ain Chock/Maroc	Examineur
	S. Grelier	Professeur, Université Bordeaux I/France	Examineur

DEDICACE

Je dédis cette thèse à...

*Mon père, Mohammed BELALIA, un homme qui a vécu pour sa famille.
« J'espère mon père que tu es fier de ton fils »*

*Ma mère, Zohra MOUMIDA, une femme qui a sacrifié sa vie pour ces enfants.
« J'espère ma mère que je serai toujours à la hauteur de tes attentes »*

*Ma grande mère, Khadija MAJDALLAH, une femme qui m'a allaité amour et sagesse et qui a
veillé sur moi et mes sœurs toute notre vie.*

Mon oncle, Driss MOUMIDA, qui est pour moi un père et une idole.

*Ma tante, Najat CHADID, qui est pour moi à la fois une mère, une sœur et une amie et qui n'a
apporté que du bonheur dans ma vie.*

Ma tante Malika MOUZAHIME, qui m'aime comme un fils et que j'aime comme une mère

*Mes frères, Khalid, Hanane, Mouna, Wafaa, Kawtar, Rania, Meriam et Amin, qui sont le soleil
de mes jours et les étoiles de mes nuits.*

À toute ma famille.

Mes amis ou plutôt mes frères du derb el houria et des villages universitaires à Bordeaux.

Je présente mes sincères remerciements à...

Monsieur le Professeur Philippe GERARDIN, du Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le Matériau Bois de l'Université Henry POINCARÉ (Nancy I), qui a aimablement accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Monsieur le Professeur Saïd SEBTI, du Laboratoire de Chimie Organique Catalyse et Environnement, qui a aussi aimablement accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Monsieur le Professeur Alain CASTELAN, Directeur du laboratoire de Chimie des Substances Végétales (LCSV), pour avoir mis à ma disposition l'ensemble des équipements du LCSV lors des trois années de thèse, et pour avoir accepté d'être président du jury lors de soutenance de cette thèse.

Monsieur le Professeur Aziz EL AMERANI, du Laboratoire de Chimie Agroalimentaire et Chimie des Substances Naturelles Végétales et Marines, de l'Université Hassan II, qui a accepté d'être examinateur de ce travail de thèse.

Monsieur le Professeur Stéphane GRELIER du LCSV, pour avoir accepté de codiriger cette thèse, je le remercie aussi de tout mon cœur pour son extrême gentillesse, sa disponibilité et sa patience qui est sans limite, ce qui m'a permis d'accéder à quelques gouttes de son immense savoir.

Monsieur le Professeur Mohammed BENAÏSSA, du Laboratoire de Chimie Agroalimentaire et Chimie des Substances Naturelles Végétales et Marines, de l'Université Hassan II, qui a aussi accepté de codiriger cette thèse et qui m'a considéré comme un fils et non comme un étudiant, et auprès duquel j'ai appris beaucoup de choses, qui ont dépassé le scientifique pour atteindre tous les niveaux de la vie.

Madame le Docteur Véronique COMA, du LCSV, qui a aussi accepté de codiriger cette thèse et avec laquelle les heures de travail sont devenues du pur bonheur grâce à sa gentillesse, son dévouement, sa disponibilité et sa bonne humeur.

Mes amis, Emmanuel CAZEILS, Nicolas BORDENAVE, William HOAREAU, Rodrigue SAFOU-TCHIAMA, Philippe TINGAUT, Khalid ZIANI, Elise PORTES, et Marcel MEDZEGUE, ainsi que tous les membres du LCSV et de l'institut du PIN, pour leur grand soutien au cours de ces trois années de thèse. Je leur souhaite à tous beaucoup de réussite et de bonheur.

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE	7
MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
Chapitre 1. La durabilité du bois : naturelle et conférée.....	15
1.1. Dégradation du Bois par les champignons lignivores.....	15
1.1.1. Dégradation de la cellulose.....	15
1.1.1.1. Dégradation de la cellulose par la pourriture blanche.	15
1.1.1.2. Dégradation de la cellulose par la pourriture cubique.	16
1.1.1.3. Dégradation de la cellulose par la pourriture molle.	17
1.1.2. Dégradation des hémicelluloses.....	17
1.1.2.1. Mode d'action des hémicellulases.....	18
1.1.3. Dégradation de la lignine.....	19
1.2. Autres organismes destructeurs	19
1.2.1. Les champignons de bleuissement.	19
1.2.2. Les insectes à larves xylophages.....	20
1.2.3. Les autres insectes moins destructeurs.	21
1.2.4. Les termites.....	22
1.2.5. Les térébrants marins.....	22
1.3. La durabilité naturelle du bois.	23
1.4. Les classes de risques.....	24
1.5. Durabilité conférée.....	26
1.5.1. Les goudrons et les huiles.....	26
1.5.2. Les produits organiques.....	27
1.5.3. Les sels métalliques.....	28
1.5.4. Alternatives.....	30
Chapitre 2. Préservation des aliments et caractères physiologiques des souches étudiées.	32
2.1. Préservation - sécurité sanitaire des aliments.	32
2.2. Caractères physiologiques et pathologiques des souches étudiées : <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Salmonella typhimurium</i>	34
2.2.1. Caractères généraux des <i>Listeria</i>	34
2.2.1.1. Morphologie et structure.....	34
2.2.1.2. Pathologie humaine : toxi-infection alimentaire (<i>L.monocytogenes</i>).	35
2.2.2. Caractères généraux des <i>Salmonella</i>	35
2.2.2.1. Morphologie et structure.....	35
2.2.2.2. Pathologie humaine.	36
Chapitre 3. Quelques généralités sur les bioemballages actifs.	38
3.1. Les biomatériaux ou bio-emballages.	38
3.1.1. Formation et propriétés des bioemballages.	39
3.1.1.1. Fabrication des films par voie humide (casting).	39
3.1.1.2. Résistance des films à l'immersion dans l'eau.	39
3.1.1.3. Plastifiants.....	40
3.1.1.4. Propriétés mécaniques.	40
3.1.1.5. Propriétés barrières à la vapeur d'eau.....	40
3.1.2. Les biopolymères osidiques.....	41
3.1.2.1. L'amidon.....	41
3.1.2.2. Matériaux à base de cellulose et dérivés.....	42
3.2. Les emballages actifs.	44
3.2.1. Les différents types d'un emballage actif.....	44

3.2.2. Emballages anti-microbiens.....	47
Chapitre 4. Le chitosane : obtention, caractéristiques et activité antimicrobienne.	53
4.1. Voie d'obtention.	53
4.2. Caractéristiques du chitosane.	54
4.3. Propriétés antimicrobiennes.	55
4.3.1. Activité antibactérienne du chitosane.....	55
4.3.2. Activité antifongique du chitosane.....	56
4.4. Mode d'action du chitosane.....	57
4.5. Activité du chitosane en fonction des paramètres abiotiques.....	57
4.6. Quelques modifications chimiques du Chitosane, utilisées pour augmenter sa solubilité et son activité anti-microbienne.	58
4.7. Exemples d'utilisation du chitosane.	60
RESULTATS ET DISCUSSION.....	63
Chapitre 5. Synthèse du N,N,N-triméthylchitosane.	65
5.1. Alkylation du chitosane.....	65
5.2. Quaternisation du chitosane.	68
5.3. Conclusion.....	70
Chapitre 6. Préservation du bois.....	71
6.1. Traitement du bois par le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane.....	71
6.2. Test du lessivage.....	72
6.3. Traitement du bois par le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane : évaluation de l'efficacité anti-fongique.....	74
6.4. Étude de l'action du N,N,N-triméthylchitosane sur la croissance des souches fongiques.....	81
6.5. Conclusion.....	82
Chapitre 7. Étude des bioemballages.....	84
7.1. Bioactivité des matériaux élaborés.	84
7.1.1. Activité anti-bactérienne des bioemballages.	84
7.2. Étude comparative entre l'action du chitosane et celle du N,N,N-triméthylchitosane sur <i>Listeria innocua</i> en milieu liquide : phase de latence.	86
7.3. Sensibilité des bioemballages à l'eau à l'état vapeur et liquide.	88
7.3.1. Sensibilité des bioemballages à la vapeur d'eau.....	88
7.3.2. Sensibilité des bioemballages à l'eau liquide.	89
7.4. Conclusion.....	92
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	93
PARTIE EXPERIMENTALE	97
Chapitre 8. METHODES D'ANALYSES.....	99
8.1. Spectroscopie d'Infra-Rouge (FTIR).....	99
8.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).	99
8.3. Détermination du degré de quaternisation du N,N,N-triméthylchitosane.....	99
8.4. Dosage de l'azote du chitosane par la méthode de Kjeldahl.	100
Chapitre 9. SYNTHÈSE.....	101
9.1. Produits chimiques utilisés pour ce travail.....	101
9.2. Synthèse du N-méthylchitosane.....	101
9.3. Synthèse du N,N,N-triméthylchitosane.....	102
Chapitre 10. PRÉSERVATION DU BOIS.....	103
10.1. Echantillonnage.....	103
10.2. Traitements des éprouvettes.	103
10.3. Lessivage, séchage et conditionnement des éprouvettes.....	104
10.4. Détermination des taux de lessivage.....	104

10.5. Cultures fongiques.	104
10.6. Répartition des éprouvettes et exposition aux souches fongiques.	105
10.7. Examen des éprouvettes et évaluation de l'efficacité des traitements.	105
10.8. Tests de l'activité antifongique intrinsèque du N,N,N-triméthylchitosane en boîte de Pétri.	106
Chapitre 11. ÉTUDE DES BIOMEBALLAGES.	107
11.1. Fabrication des films par casting.	107
11.1.1. Films homogènes à base d'HPC.	107
11.1.2. Films d'HPC associée à du chitosane ou au N,N,N-triméthylchitosane.	107
11.2. Pré-culture de 18 h.	107
11.3. Activité anti-microbienne des films.	108
11.4. Activité anti-microbienne des enrobages.	108
11.5. Étude de l'effet antibactérien du chitosane et du N,N,N-triméthylchitosane sur <i>Listeria innocua</i>	108
11.6. Teneur en eau des films.	109
11.7. Solubilité des films dans l'eau.	109
11.8. Goniométrie ou mesure de l'angle de contact.	109
11.9. Étude de la sensibilité des films à la vapeur d'eau : Détermination du Coefficient de Transfert à la Vapeur d'Eau (CTVE).	110
11.10. Propriétés mécaniques.	110
Références Bibliographiques	111

Table des illustrations

Figure 1 : Cycle de développement d'un insecte Coléoptère.....	20
Figure 2 : Images représentant : A) un capricorne des maisons et B) une larve d'un insecte coléoptère.....	20
Figure 3 : Aspect d'un bois attaqué par un insecte à larve xylophage.....	21
Figure 4 : Images représentant des abeilles charpentières.....	21
Figure 5 : Sirex (insecte de bois frais).....	21
Figure 6 : Cycle de développement des Termites.....	22
Figure 7 : Aspect d'un bois attaqué par des mollusques.....	23
Figure 8 : Exemple de PAH : Benzopyrène.....	27
Figure 9 : Structure chimique du Thymol, du Carvacol et du Cuminaldéhyde (K. Voda et al 2003).....	31
Figure 10 : Évolution du nombre de Salmonella portés à la connaissance du Centre National de Référence des Salmonella en France entre 1988 et 2003.....	34
Figure 11 : Schématisation de la paroi cellulaire d'une bactérie Gram positif et d'une bactérie Gram négatif.....	36
Figure 12 : Structure chimique de l'amylopectine.....	41
Figure 13 : Structure théorique idéale de l'HPC.....	44
Figure 14 : Emballage anti-microbien «addition de sachet qui contient l'agent anti- microbien dans le support ».....	49
Figure 15 : Emballage anti-microbien «incorporation de l'agent anti-microbien dans le support».....	50
Figure 16 : Structure chimique de la HMT (F. Devlieghere et al 2000).....	50
Figure 17 : Emballage anti-microbien « enrobage du support par un agent anti-microbien».....	51
Figure 18 : Emballage anti-microbien « immobilisation de l'agent anti-microbien».....	52
Figure 19 : Structure chimique idéale de la chitine.....	53
Figure 20 : Structure chimique idéale du chitosane.....	54
Figure 21 : Structure chimique du NMA-HTCC.....	59
Figure 22 : Quaternisation du chitosane.....	66
Figure 23 : Spectres Infra-Rouge du chitosane, N-méthylchitosane, N-éthylchitosane et N-heptylchitosane.....	67
Figure 24 : Spectre RMN ¹ H du N,N,N-triméthylchitosane.....	68
Figure 25 : Cinétique du lessivage du chitosane (CHI) et du N,N,N-triméthylchitosane (TMC).....	73
Figure 26: Perte de masse des éprouvettes traitées avec le chitosane et non-lessivées.....	75
Figure 27: Perte de masse des éprouvettes traitées avec le chitosane et lessivées.....	76
Figure 28: Perte de masse des éprouvettes traitées avec N,N,N-triméthylchitosane et non-lessivées.....	76
Figure 29: Perte de masse des éprouvettes traitées avec N,N,N-triméthylchitosane et lessivées.....	77
Figure 30 : Aspects des éprouvettes témoins et des éprouvettes traitées avec le chitosane (CHI) ou le N,N,N-triméthylchitosane (TMC) et lessivées, après incubation pendant 8 semaines, avec un agrandissement de 14 fois.....	79
Figure 31 : Images en microscopie électronique d'une éprouvette témoin et des éprouvettes traitées avec le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane après attaque fongique du C. Versicolor (x1000).....	80
Figure 32 : Action du N,N,N-triméthylchitosane (TMC) sur les souches fongiques étudiées après 8 jours d'incubation.....	81
Figure 33 : Étude comparative de l'action du chitosane et celle du N,N,N-triméthylchitosane sur L. innocua en milieu liquide (phase de latence).....	87
Tableau 1 : Type de formulations des CCA (J.A.Hingston et al 2001).....	29
Tableau 2 : Principales caractéristiques des cas de listériose identifiés par la DO et le CNR des listeria en France entre 1999-2003 (Institut national de veille sanitaire).....	33
Tableau 3 : Comparatif des propriétés physiques des différentes catégories d'emballages (Mathlouthi 1996).....	38
Tableau 4: Teneurs en amylose et en amylopectine d'amidons naturels.....	42
Tableau 5 : Quelques exemples de système d'emballages interactifs commerciaux (Coma, 2001).....	46
Tableau 6 : Quelques exemples d'emballage antimicrobien.....	48
Tableau 7 : Les concentrations minimales d'inhibition de quelques bactéries par le Chitosane (X. F. Liu et al 2001).....	55
Tableau 8 : Taux d'inhibition de quelques souches fongiques en fonction de la concentration du chitosane (Laflamme et al 1999).....	56
Tableau 9 : Les concentrations minimales d'inhibition de quelques moisissures par le Chitosane (X. F. Liu et al 2001).....	56

Tableau 10 : Quelques modifications chimiques du chitosane.	60
Tableau 11 : Absorptions des groupements chimiques présents dans le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane (M. J. Charrier et al 1995, L. Chen et al 2003, K. V. de Velde et P. Kiekens 2004, X. Peng et L. Zhang 2005).	67
Tableau 12 : Taux du traitement des éprouvettes du bois par le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane.	72
Tableau 13 : Taux du lessivage du Chitosane et du N,N,N-triméthylchitosane.	73
Tableau 14 : Activité anti-bactérienne des films d'HPC, d'HPC/CHIT et d'HPC/TMC des <i>L. monocytogenes</i> et <i>S. typhimurium</i> .	85
Tableau 15 : Activité anti-bactérienne des enrobages à base d'HPC, d'HPC-CHI et d'HPC-TMC sur les bactéries <i>L. monocytogenes</i> et <i>S. typhimurium</i> .	85
Tableau 16 : Les coefficients de transfert de la vapeur d'eau ($\text{g.m}^{-2}.\text{Jour}^{-1}.\text{atm}^{-1}$) mesurés pour des films de 50 cm^2 de surface à 0-50 % d'HR et 23 °C. Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions suivies de leurs intervalles de confiance ($p = 95 \%$).	89
Tableau 17 : Angles de contact θ mesuré à l'interface eau-film. Les valeurs sont des moyennes de 5 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance ($p=95 \%$).	90
Tableau 18 : Propriétés mécaniques des films d'HPC, HPC-CHI et HPC-TMC.	91

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Notre objectif de recherche dans cette thèse consistait, dans un premier temps, à synthétiser des biocides en valorisant des ressources renouvelables, comme le chitosane. Ce biopolymère est obtenu après déacétylation de la chitine, constituant de la paroi des crustacés et des insectes.

Sous sa forme cationique, le chitosane est pourvu d'une activité antimicrobienne. Sa quaternisation permet d'obtenir des ammoniums quaternaires hydrosolubles et potentiellement un renforcement de cette activité.

Les performances de ce biocide ont été évaluées et discutées dans deux types d'applications :

1. Pour la préservation du bois.
2. Pour la préservation des aliments par l'intermédiaire de bioemballages antibactériens.

En ce qui concerne la préservation du bois, le matériau est aujourd'hui traité par des produits chimiques, comme la créosote, le pentachlorophénol (PCP) et les sels métalliques afin de lutter contre les dégradations biologiques qu'il subit. Cependant, la plupart de ces produits ont des effets néfastes sur l'environnement.

La créosote, qui est un excellent fongicide et insecticide, est désormais soumise à beaucoup de restrictions, (Directive européenne Dir 92/C 157/05 1992) et cela à cause de la toxicité de ses composants (hydrocarbures polyaromatiques) vis-à-vis de l'environnement. En ce qui concerne le PCP et ses sels, dont la toxicité est due essentiellement à l'existence d'impuretés (dioxines, furanes), leur usage est interdit pour la préservation du bois aux Etats-Unis depuis 1986. En Europe, la directive européenne Dir 91/173/EEC,1991 prévoit beaucoup de restriction d'usage.

Les formulations à base de sels métalliques ont été très utilisées ces dernières années. Parmi 16,7 millions de m³ de bois traité aux Etats-unis d'Amérique en 1996, 13,2 millions de m³ ont été traités par des formulations à base de sels métalliques soit 79,1%. Ces éléments métalliques peuvent se révéler très nocifs s'ils sont présents en quantités très importantes. Ainsi le chrome conduit, dans les plantes, à une diminution de la synthèse en chlorophylle et de certaines activité enzymatique (catalase, peroxydase) et cela en concurrençant le fer, élément indispensable pour ces activités. Pour les micro-organismes (bactéries et algues) il inhibe la respiration et la photosynthèse. Il faut savoir que le chrome est parmi les éléments les plus utilisés dans ces formulations métalliques (cuivre, chrome et arsenic CCA, cuivre, chrome et bore CCB, cuivre chrome et phosphore CCP).

La gestion des bois traités en fin de service vient s'ajouter à ces inconvénients. La combustion étant écartée (génération de gaz toxiques), des traitements chimiques (utilisation de complexant comme l'EDTA et l'acide oxalique) et biologiques (utilisation des bactéries telle que *Bacillus licheniformis* en présence d'acide oxalique) ont permis d'extraire jusqu'à 78 % de Cu, 97 % de Cr et 93 % d'As. Cependant, le passage à l'échelle industrielle reste à effectuer.

Il apparaît donc nécessaire de rechercher de nouvelles molécules pour la préservation du bois dont l'impact éco-toxicologique est faible. C'est dans ce contexte que s'inscrit la première partie de cette thèse, dans laquelle la synthèse d'ammonium quaternaire du chitosane a été réalisée. L'efficacité dans la préservation du bois a été évaluée contre des souches fongiques, issues des régions tempérées et tropicales.

En ce qui concerne la sécurité alimentaire, la croissance des bactéries pathogènes, telles que *Listeria monocytogenes* ou *Salmonella typhimurium*, dans certains types de produits alimentaires pose aujourd'hui encore des problèmes de santé publique.

Pour répondre à la demande croissante d'amélioration de la qualité et de la sécurité des produits alimentaires, l'élaboration d'**emballages actifs** est en pleine expansion.

Un grand nombre de technologies est déjà utilisé pour réaliser ces emballages actifs, capables d'étendre la durée de vie des produits en agissant sur leur environnement et de contrôler leur qualité par absorption d'oxygène et d'éthylène, libération de dioxyde de carbone, rétention d'eau vapeur ou liquide, témoins de température, *etc.*

L'emballage peut également devenir antimicrobien. Cette propriété peut être obtenue par addition d'agent antimicrobien dans le matériau.

La production et l'utilisation en quantités continuellement croissantes d'emballages plastiques à base de macromolécules synthétiques posent aujourd'hui des problèmes de non-renouvellement et de pollution de l'environnement. Les démarches de recyclage, aussi importantes en soit-elles, sont insuffisantes pour répondre à cette pollution. L'étude des emballages biodégradables, d'origine végétale ou microbienne, possédant des propriétés barrières à la vapeur d'eau et aux gaz (O₂ et CO₂) proches des performances des emballages plastiques est une voie à développer pour limiter cette pollution tant visuelle que chimique.

Divers matériaux glucidiques, protéiques et lipidiques, utilisés seuls ou en mélange ont été proposés pour la formulation de ces emballages.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la deuxième partie de cette thèse, dont l'objectif consiste à élaborer et étudier des bioemballages antibactériens à base de dérivés cellulosiques et de biocides obtenus par modification chimique du chitosane.

Dans ce travail, la synthèse bibliographique est organisée en quatre chapitres :

- La durabilité du bois : naturelle et conférée.
- Préservation des aliments et caractéristiques physiologiques et pathologiques des souches étudiées : *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium*.
- Quelques généralités sur les bioemballages actifs.
- Le chitosane : obtention, caractéristiques et activité antimicrobienne.

Une partie, résultats et discussion, rassemble les résultats obtenus sur la synthèse d'ammonium quaternaire à partir du chitosane, la préservation du bois par ce biocide et l'étude des bioemballages antibactériens à base d'hydroxypropylcellulose et du chitosane ou chitosane modifié.

Enfin une partie expérimentale regroupe le matériel et les méthodes utilisés dans cette thèse.

Cette thèse est une collaboration entre deux laboratoires universitaires, dont les thématiques de recherche sont proches :

- Laboratoire de Chimie des Substances Végétales, Centre de Recherche en Chimie Moléculaire, Université de bordeaux 1, Bordeaux France.
- Équipe de Physico-chimie et Génie Agroalimentaires, Faculté des Sciences Ain chock, Université Hassan II, Casablanca Maroc.

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. La durabilité du bois : naturelle et conférée.

1.1. Dégradation du Bois par les champignons lignivores.

Les champignons sont les principaux responsables de la dégradation du bois, ces organismes assurent leur nutrition par digestion enzymatique des constituants du bois (lignine, cellulose, hémicellulose), leur action de destruction aboutit à une diminution des propriétés mécaniques du bois, la phase ultime de destruction étant la pourriture du matériau. Ils ne peuvent se développer qu'à partir d'un taux d'humidité moyenne du bois supérieur à 30 %.

La dégradation du bois par les souches fongiques ne se fait pas de la même façon, ainsi, la pourriture fibreuse dégrade la lignine, mais attaque aussi la cellulose et les hémicelluloses. Les pourritures cubique et molle de leur part dégradent la cellulose et les hémicelluloses.

1.1.1. Dégradation de la cellulose.

1.1.1.1. *Dégradation de la cellulose par la pourriture blanche.*

Constituées principalement des *basidiomycètes*, les pourritures fibreuses, appelées aussi pourritures blanches à cause de leur coloration, font partie des champignons les plus efficaces pour dégrader le bois.

L'étude de l'action enzymatique de la pourriture fibreuse sur la cellulose a été effectuée la première fois sur la pourriture blanche *Sporotrichum pulverulentum*. Selon les résultats de cette étude, cette pourriture dégrade la cellulose sous l'action des enzymes suivantes (Eriksson *et al* 1985) :

- Cinq enzymes du type endo-1,4- β -glucanase : hydrolysent les liaisons glucosidiques β (1- 4).
- Une enzyme exo-1,4- β -glucanase qui génère du cellobiose ou du glucose en agissant sur les extrémités non-réductrices des chaînes moléculaires obtenues après l'action des enzymes endo-1,4- β -glucanases.
- Deux enzymes 1,4- β -glucosidases qui hydrolysent la cellobiose en glucose.

L'action de ces enzymes se fait en synergie.

Le poids moléculaire des exo-1,4- β -glucanases est de 50000 Da, celui des endo-1,4- β -glucanases est de 30000 à 35000 Da. Les 1,4- β -glucosidases ont le poids moléculaire le plus élevé, de 165000 à 182000 Da. A l'action de ces enzymes s'ajoute celle de la cellobiose

oxydase qui oxyde la cellobiose en acide correspondant, et la quinone oxydoréductase qui réduit les quinones et les phénols qui sont sous forme radicalaire.

1.1.1.2. Dégradation de la cellulose par la pourriture cubique.

Ce sont également des *basidiomycètes*, ils attaquent essentiellement la cellulose et les hémicelluloses. La lignine subit des altérations partielles. Les champignons de pourriture brune sont essentiellement associés aux conifères.

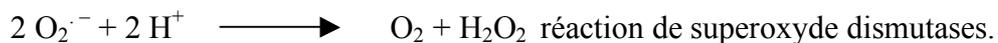
Lors de la dégradation de la cellulose par la pourriture cubique, les filaments de cette dernière se développent dans les lumens cellulaires et ils se lient à la paroi S₃ qui est relativement non-dégradée. C'est la paroi S₂ qui subit la dégradation la plus importante.

Cette dégradation du bois par la pourriture brune est une dégradation non-enzymatique, puisque les éléments qui interviennent dans ce processus sont le Fe²⁺ et H₂O₂, selon la réaction Fenton (G. Xu, B. Goodell 2001) :

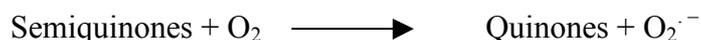


Les radicaux libres $\cdot\text{OH}$ dégradent la cellulose en petits éléments (cellobiose et glucose).

L'eau oxygénée provient de la réduction du radical superoxyde O₂⁻ (SOR).



Le SOR est le résultat de l'oxydation des hydroquinones :



La réduction du Fe³⁺ (forme sous laquelle le fer existe dans le bois) en Fe²⁺ est effectuée par des bio-complexants tel le 4,5-diméthoxy-1,4-benzènediol et le 2,5-diméthoxy-1,4-benzènediol. Ces composés ont été isolés de plusieurs milieux de culture de la pourriture cubique.



Pour comprendre le mécanisme d'action de la pourriture brune, G. Xu et B. Goodell (2001) ont étudié l'effet des concentrations de Fe³⁺, du H₂O₂, des bio-complexants et du pH sur la dégradation de la cellulose. Les résultats obtenus montrent que plus le rapport Fe³⁺/bio-complexant augmente plus la dégradation de la cellulose est importante. Cependant cette conclusion reste valable seulement pour des rapports Fe³⁺ / bio-complexants qui sont inférieurs à 14 pour les réactions de courte durée (3h) et inférieurs à 100 pour des réactions de longue durée (48h). L'existence de ce point critique est due à la compétition qui s'établit entre

la réaction de la cellulose avec les radicaux libres OH et celle des semiquinones avec ces mêmes radicaux libres. En ce qui concerne l'eau oxygénée, plus sa concentration augmente plus la dégradation de la cellulose devient importante. Pour le pH, un milieu acide favorise la dégradation de la cellulose, cependant dans un milieu très acide il n'y aura pas de dégradation car les radicaux libres OH ont une tendance à se recombinaer.

1.1.1.3. *Dégradation de la cellulose par la pourriture molle.*

La pourriture molle est due à des attaques des diverses souches fongiques. Ces attaques se produisent essentiellement sur la cellulose. Cette dégradation est caractérisée par la formation de cavité sous forme de cône dans les parois secondaires S₂ (les parois S₃ ne sont pas attaquées à cause de leur forte teneur en lignine), mais il peut aussi y avoir d'autres types d'attaques comme la cavité conique avec érosion ou seulement l'érosion. L'action enzymatique de la pourriture molle est similaire à celle de la pourriture blanche. Enfin, la pourriture molle peut dégrader une cellulose fortement cristalline.

1.1.2. Dégradation des hémicelluloses.

Les enzymes qui dégradent les hémicelluloses sont des hydrolases, et plus particulièrement des hémicellulases (R. F. H. Dekker 1985).

Dans ces hémicellulases, on trouve des β -D-galactanases, β -D-mannanases, β -D-xylanases. Ces enzymes sont les plus importantes, mais il y a aussi d'autres enzymes qui dégradent les hémicelluloses, par exemple, β -xylosidases, β -D-galactosidases, β -D-mannosidases et α -L-arabinosidases.

Toutes ces enzymes agissent en synergie, ainsi, par exemple, l'action du β -D-xylanases génère du xylobiose qui est dégradé par la β -xylosidases en xylose.

Au cours de l'action des hémicellulases, une exo-enzyme agit sur les unités terminales de la chaîne moléculaire et il y a libération d'un monosaccharide et en même temps une endo-enzyme agit sur les liaisons β 1-4 ou bien β 1-3. Cette action s'accompagne par une chute du degré de polymérisation suivi de la libération de mono ou disaccharides. Ces derniers seront dégradés par les β -xylosidases, α - et β -D-galactosidases, β -D-mannosidases, α -L-arabinosidases.

1.1.2.1. Mode d'action des hémicellulases

* β -1,4-D- Xylanases.

Cette enzyme est une endo-enzyme, elle hydrolyse les liaisons 1,4- β -D des xylanes dans les hémicelluloses suivantes : L-arabino-D-xylanes, L-arabino-D-glucurano-D-xylanes et D-glucurano-D-xylanes.

Des β -1,4-D-Xylanases bien purifiées peuvent dégrader la cellulose en présence des hémicelluloses.

Deux types de xylanases peuvent être distinguées :

- Debranching xylynases.
- Non-debranching xylynases.

Les debranching xylynases sont capables d'hydrolyser les arbinoglucuranoxylanes tout en libérant du L-arabinose. *L'Aspergillus niger* produit six endo-xylynases qui sont toutes des debranching xylynases.

Les non-debranching xylynases dégradent les xylanes en molécules de faible poids moléculaire comme les Xyl₂ (xylobiose), Xyl₃, Xyl₄, Xyl₅ ou le xylose, mais elles ne peuvent libérer les branchements qui existent sur la chaîne principale.

* 1-4- β -Mannanases.

Ces enzymes existent sous la forme endo et exo. Elles hydrolysent les D-galacto-D-mannanes, D-mannanes, et libèrent des Man₆, Man₅, Man₄, Man₃, Man₂ et le mannose.

* β -D- Galactanases.

Ces enzymes dégradent les L-arabino-D-galactananes et D-galactananes en galactose et en oligosaccharides de galactose.

L'action de ces enzymes se fait comme suit :

- 1- En premier lieu, l'action des exoglucosidases sur les hémicelluloses permet la libération des substituants présents sur la chaîne macromoléculaire.
- 2- En deuxième lieu, les endohémicellulases dégradent la chaîne macromoléculaire.

Cependant les debranching endoxylynases constituent une exception à ce mode d'action, car ils sont capables de libérer le L-arabinose à partir d'arabinoxylanes et cela sans l'assistance d'arabinosidases.

Les exohémicellulases agissent sur les extrémités de la chaîne macromoléculaire et leur action s'arrête aux branchements qui existent sur cette chaîne.

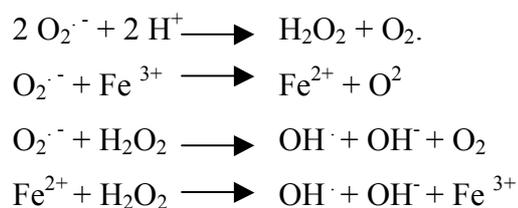
1.1.3. Dégradation de la lignine.

La dégradation de la lignine se fait essentiellement par la pourriture blanche. Cette dégradation se fait sous l'action des enzymes suivantes : Lignine peroxydase, Manganèse peroxydase et laccase (A. Leonowicz *et al* 1999, M. Tuomela *et al* 2000).

L'action de la lignine peroxydase permet une oxydation des aldéhydes aromatiques par l'eau oxygénée. Celle du Manganèse peroxydase est aussi une oxydation du Mn^{2+} en Mn^{3+} par l'eau oxygénée. Cette réaction s'accompagne de la libération des radicaux libres $\cdot OH$ et des ions OH^- .

L'action de la laccase est une oxydation des hydroquinones (1,4-benzènediol) par l'oxygène en semiquinones, qui est oxydée à son tour en quinones. Ces oxydations s'accompagnent de la libération du radical superoxyde $O_2^{\cdot -}$ (H. D. Youn *et al* 1995).

Ce radical est un élément important dans plusieurs réactions intervenant dans la dégradation de la lignine:



1.2. **Autres organismes destructeurs**

1.2.1. Les champignons de bleuissement.

L'attaque par ce type de champignon entraîne une coloration bleuâtre de l'aubier des résineux et de certains feuillus mais pas de modifications importantes des propriétés mécaniques du bois. Ces champignons se nourrissent sur les réserves contenues dans les cellules et non au détriment de la matière lignocellulosique. Le bois bleui peut être admis pour tous les emplois abrités où les conditions d'aspect sont sans importance. Toutefois, le bois serait plus sensible à des altérations ultérieures.

1.2.2. Les insectes à larves xylophages.

Ils appartiennent à l'ordre des *coléoptères*. Ce sont les larves de ces insectes qui détruisent le bois pour se nourrir. Pendant tout le cycle larvaire, dont la durée est variable selon les espèces et les conditions ambiantes, ces larves creusent des galeries et n'en sortent que pour se transformer en insecte adulte, qui ne vit que quelques semaines, sans se nourrir, pour s'accoupler et pondre dans les cavités du bois. Les larves se développent de préférence dans l'aubier, mais aussi dans le bois parfait des essences non-duraminisées (Figure 1).

En général, ces insectes dégradent spécifiquement certains types d'essences, ainsi le capricorne des maisons (Figure 2) attaque exclusivement les résineux, l'hespérophone dégrade les feuillus, les petites et les grosses vrillettes dégradent les feuillus mais aussi les résineux.

La zone du bois attaqué peut être profonde, mais comme l'infection a lieu par la surface du bois, la protection pourra être seulement superficielle. La Figure 3 montre l'aspect du bois attaqué par des larves xylophages.

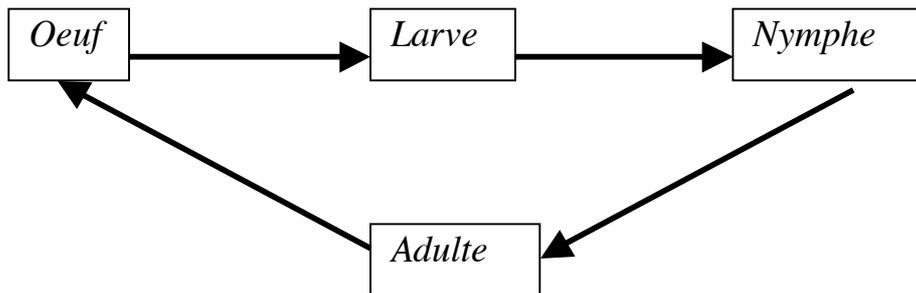


Figure 1 : Cycle de développement d'un insecte Coléoptère.



A



B

Figure 2 : Images représentant : A) un capricorne des maisons et B) une larve d'un insecte coléoptère.



Figure 3 : Aspect d'un bois attaqué par un insecte à larve xylophage.

1.2.3. Les autres insectes moins destructeurs.

Ce sont les insectes de bois frais, Sirex (Figure 5) et Piqûres noires, qui terminent leur développement larvaire dans le bois en œuvre, mais les adultes formés sont incapables d'y pondre. Il s'agit aussi d'insectes nidificateurs, comme l'abeille charpentière (Figure 4) qui creuse des galeries dans le bois tendre ayant auparavant fait l'objet d'une attaque fongique, pour y installer leur ponte.

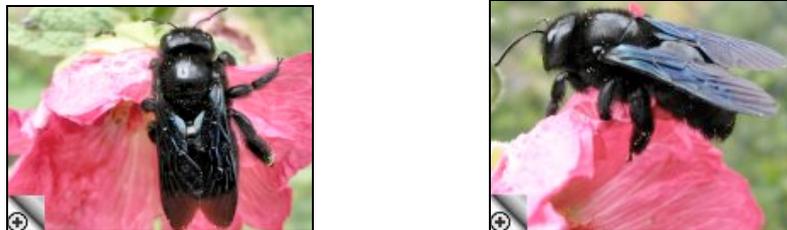


Figure 4 : Images représentant des abeilles charpentières.



Figure 5 : Sirex (insecte de bois frais).

1.2.4. Les termites.

Ces insectes de l'ordre des isoptères ont une biologie particulière. Ce sont des insectes sociaux dont la colonie est organisée en castes d'individus bien spécialisés. Les uns, sexués, assurent la reproduction de l'espèce, d'autres, les soldats, défendent la colonie, enfin les ouvriers construisent l'habitat et assurent la nutrition des différentes castes. Seuls ces derniers sont responsables de la dégradation du bois. La Figure 6 représente le cycle de développement des termites.

Dans les termites, on distingue :

- Les termites souterrains : France et Pays des côtes méditerranéennes.
- Les termites de bois sec : sud de l'Europe, régions tropicales.
- Les termites arboricoles : Régions tropicales.

Peu d'essences sont capables de résister aux termites. Le bois est dégradé dans tout son volume et l'attaque est difficile à déceler, car étant lucifuges, elles ne se manifestent pas à l'extérieur.

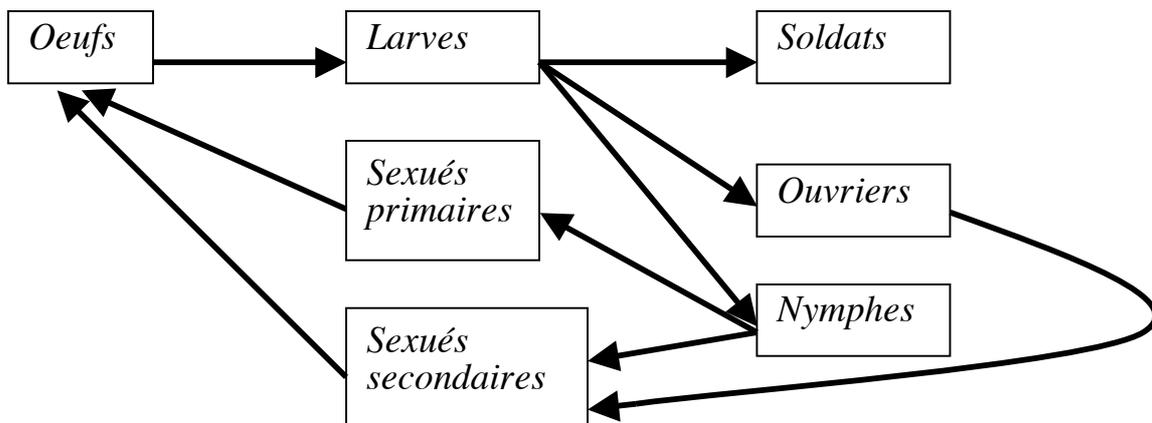


Figure 6 : Cycle de développement des Termites.

1.2.5. Les térébrants marins.

Les animaux qui dégradent le bois immergé dans l'eau salée appartiennent à deux embranchements différents : les mollusques (tarets) et les crustacés (limnoria). Les tarets sont les plus dangereux car ils attaquent le bois dans tout son volume et toutes les essences. Ils s'en nourrissent et s'y abritent. Seules résistent les essences à haute teneur en silice. Les dégâts causés par les limnorias sont plus superficiels. L'aspect d'un bois attaqué par des térébrants marins est illustré par la Figure 7.



Figure 7 : Aspect d'un bois attaqué par des mollusques.

1.3. La durabilité naturelle du bois.

La durabilité naturelle du bois est définie comme étant sa résistance intrinsèque aux attaques des souches fongiques et des insectes. La grande variabilité du bois donne une durabilité naturelle propre à chacune de ces composantes; aubier, bois parfait, duramen.

La zone qui correspond à l'aubier a une épaisseur variable selon les essences, elle peut s'étendre sur quelques cernes ou sur plusieurs centimètres. C'est un tissu peu dense, de couleur pâle, perméable et physiologiquement actif, car il contient des substances de réserve, comme l'amidon, ce qui le rend attractif et peu résistant aux agents biologiques.

D'une manière générale, tous les aubiers sont considérés comme périssables, même ceux qui correspondent à des essences dont le duramen est très durable (*Padouk*). En revanche ce tissu est très imprégnable, ce qui compense sa faible durabilité naturelle.

Plus proche du centre de l'arbre se trouve parfois dans les essences tropicales, une zone de transformation de l'aubier en bois parfait d'épaisseur variable, elle est appelée *zone intermédiaire*. La durabilité de cette zone est supérieure à celle de l'aubier, mais inférieure à celle du duramen (*Azobé*).

Le bois parfait non-duraminisé possède en général les mêmes caractéristiques que l'aubier, sa durabilité bien que variable, est assez faible, ainsi le capricorne des maisons attaque l'épicéa dans tout son volume, aubier et bois parfait non-duraminisé, alors qu'il ne dégrade que l'aubier des pins qui possèdent un vrai duramen.

Il existe aussi au centre de l'arbre une zone très vulnérable, constituée de quelques cernes annuels peu denses : c'est le bois juvénile.

Le bois parfait duraminisé est un bois qui a subi plusieurs transformations physiques : obturation de certains éléments, comme les vaisseaux, par les excroissances de parenchyme

appelées *thylles*, fermeture des ponctuations qui avaient un rôle de filtre dans l'aubier, ce qui constitue une barrière contre la pénétration des agents biologiques destructeurs. Le duramen acquiert également des substances chimiques toxiques pour les agents biologiques. Ces substances ont été extraites et analysées, de nature phénolique, elles appartiennent à quatre groupes :

- Les polyphénols comprenant les stilbènes et les flavanoïdes.
- Les terpénoïdes.
- Les tannins.
- Les tropolones qui sont des dérivés des terpénoïdes.

L'activité antifongique de ces composés a été évaluée après extraction du bois par l'eau ou par des solvants organiques. Il s'avère que leur extraction progressive entraîne une diminution de la durabilité naturelle par rapport à celle du bois d'origine.

En tant que biocides naturels, il était intéressant d'extraire des tannins à partir d'essence durable et d'en imprégner des essences peu durables ou des aubiers. Une faible augmentation de la durabilité a été obtenue. En fait en dehors du bois, les extraits phénoliques sont labiles, ils s'oxydent à l'air et perdent leur toxicité. Pour obtenir un résultat acceptable, il faudrait des concentrations, en tannins très élevées, ce qui est techniquement et économiquement impossible.

Le mécanisme d'action de ces composés, quand ils sont naturellement présents dans le bois, est jusqu'à présent mal connu. Ils ont la capacité de former des complexes avec de nombreux polymères comme les protéines, ils doivent ainsi inhiber les enzymes des champignons comme les cellulases. De même ils peuvent complexer des ions métalliques comme le fer, élément indispensable à la croissance des champignons.

Pour T.P.Schultz et D.D. Nicholas (2000), l'action antifongique de ces composés se fait en synergie avec leur action antioxydante. Leur travail a montré que l'association d'un antioxydant synthétique, le BHT(2,6-tert-butyl-méthylphénol) avec un antifongique améliore considérablement l'activité de ce dernier. L'antifongique utilisé est le propiconazole.

1.4. Les classes de risques

À chaque situation climatique d'emploi (à l'abri, au contact du sol,...) correspond des risques de développement des organismes biologiques.

La norme NF EN 335 (1992) définit cinq classes de risque biologique, chacune d'elle correspond à des emplois de bois pour lesquels les risques biologiques sont les mêmes.

* Classe de risque 1.

- *Situation* : bois sous abri, entièrement protégé des intempéries et non-exposé à l'humidification (taux d'humidité inférieur à 20 %).
- *Risques biologiques* : insectes à larves xylophages et termites dans les zones infestées.
- *Exemples* : aménagements intérieurs, meubles, parquets, menuiseries intérieures.

* Classe de risque 2.

- *Situation* : bois sous abri et entièrement protégé, où une humidité ambiante temporaire peut conduire à une humidification occasionnelle mais non-persistante à 20%.
- *Risques biologiques* : insectes à larves xylophages, champignons (décolorations et plus rarement des champignons lignivores) et termites dans les zones infestées.
- *Exemples* : charpentes en période de chantier, ossatures.

* Classe de risque 3.

- *Situation* : bois non-abrité, hors contact du sol, qui peut être continuellement exposé aux intempéries, ou bien être à l'abri mais soumis à une humidification fréquente supérieure à 20 %.
- *Risques biologiques* : insectes à larves xylophages, champignons de décoloration mais aussi lignivores (pourritures blanches et brunes) et termites dans les zones infestées.
- *Exemples* : menuiseries extérieures charpentes soumises aux intempéries.

* Classe de risque 4.

- *Situation* : bois en contact avec le sol ou l'eau douce, exposé en permanence à une humidité supérieure à 20 %.
- *Risques biologiques* : tous ceux de la classe 3 et en plus les champignons de pourriture molle.
- *Exemples* : tout bois en contact avec le sol.

*Classe de risque 5.

- *Situation* : bois en permanence exposé à l'eau salée.
- *Risques biologiques* : Tous ceux de la classe 4 mais en plus et surtout les térébrants marins.
- *Exemples* : tout bois en oeuvre dans l'eau salée comme les installations portuaires.

Les classes de risques de la norme NF EN 335 ont été définies pour les climats tempérés européens. Une classe de risque étant un état de fait dérivant d'une situation dans laquelle le bois se trouve exposé, elle ne peut être changée que par modification de la conception de

l'ouvrage (par exemple, les menuiseries extérieures abritées par une toiture, sont en classe 2, mais s'il n'y a pas cette protection, elles se trouvent en classe 3).

1.5. Durabilité conférée.

Comme nous venons de le voir, le bois est vulnérable face aux champignons lignivores, insectes xylophages et térébrants marins. Il est donc nécessaire de le préserver contre ces organismes destructeurs.

Historiquement, les produits de préservation du bois sont classés en trois grandes familles :

- Les goudrons et les huiles.
- Les composés organiques.
- Les sels métalliques.

Cependant cette classification reste arbitraire dans la mesure où un produit considéré comme organique (pentachlorophénol) peut très bien donner un sel (sel de sodium du pentachlorophénol).

1.5.1. Les goudrons et les huiles.

La créosote est de très loin le produit le plus important de cette catégorie. Elle est connue et utilisée depuis plus d'un siècle. Elle est obtenue à partir du charbon. Lorsque celui-ci est chauffé à haute température, il donne du coke, des gaz, et des goudrons.

Les goudrons ont une composition mal définie qui dépend de l'origine du charbon et des conditions de la pyrolyse. La distillation des goudrons permet de séparer la créosote (partie volatile entre 200 et 400 °C) et le résidu (partie qui distille entre 350 et 400°C). Une créosote légère contient peu de résidu, une créosote lourde en contient beaucoup.

Les créosotes légères sont surtout utilisées pour le traitement des poteaux électriques, alors que les lourdes, servent à traiter les traverses des chemins de fer.

La créosote est composée de substances acides (phénols, crésols...), de substances basiques (pyridine, quinoléine) et d'hydrocarbures aromatiques neutres (naphtalène, anthracène). La fraction neutre (hydrocarbures) permet de fixer la partie acide responsable de l'activité antifongique de la créosote qui est facilement lessivable.

Lors du traitement du bois par la créosote, l'imprégnation est favorisée par une faible viscosité. Avec les créosotes lourdes, l'imprégnation est améliorée par chauffage et sous pression. La créosote est efficace contre la plupart des champignons, des insectes et

mollusques. Hydrophobe, elle empêche la pénétration de l'eau dans le bois, elle le stabilise dimensionnellement. De plus, son prix est attractif. À côté de ces avantages, elle présente des inconvénients qui peuvent être rédhibitoires : son odeur est forte et désagréable, elle est salissante et le bois ne peut pas recevoir une finition après traitement. Mais l'élément principal qui a conduit pratiquement à son interdiction (Dir 92/C 157/05, 1992) est sa toxicité. La toxicité de la créosote est due à la présence des hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAH) qui constituent 85 % du total des hydrocarbures (J. Ahtiainen *et al* 2002). La Figure 8 donne la structure chimique d'un de ces PAH.

Une forte exposition à ces hydrocarbures polycycliques aromatiques peut causer le cancer de la peau, des poumons et celui de la vessie. L'action cancérigène de ces composés se fait par formation de liaison avec l'ADN (W. M. Baird *et al* 2005).

Les PAH peuvent aussi agir sur le système nerveux. Ainsi, des enfants nés chez des femmes ayant consommé du poisson contaminé avec des PAH, montrent des quotients intellectuels réduits, une faible mémoire visuelle et une difficulté dans la compréhension d'un énoncé (T. A. Gasiewicz 1997).

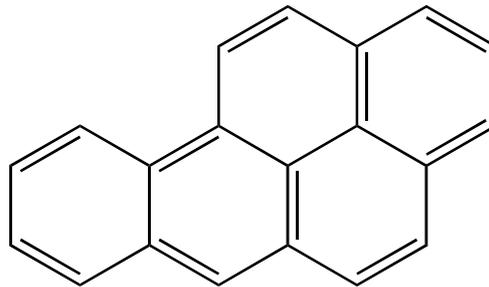


Figure 8 : Exemple de PAH : Benzopyrène.

1.5.2. Les produits organiques.

Le pentachlorophénol (PCP) était de loin le plus important produit de cette famille. C'est un solide blanc cristallisé, très peu soluble dans l'eau et très soluble dans les solvants organiques. Son sel du sodium (PCPNa) est par contre très soluble dans l'eau.

Le PCP est un bon fongicide. Il a été utilisé associé à un insecticide avec une concentration de 5% (m/m).

Cependant le PCP est un composé toxique pour les mammifères, raison pour laquelle son utilisation a été interdite aux USA depuis 1986. La toxicité du PCP est due à la présence de dioxines et de furanes.

P.Fernandez Freire et al (2005), ont montré que la présence du PCP, même à faible concentration 5 $\mu\text{Mol/l}$, avait un effet cytotoxique sur les cellules du singe. La présence du PCP dans les milieux aquatiques diminue considérablement le taux de survie des poissons (J. Muir et G. Eduljee 1999). Le caractère toxique du PCP est accentué par la présence d'autres éléments comme le cuivre (Cu^{2+}) qui est d'ailleurs un élément très utilisé dans la préservation du bois. Ben-Zhan Zhu et al 2001, ont montré qu'il y a une synergie entre l'action du PCP et du Cu^{2+} . L'exposition des cellules d'*Escherichia coli* (prises comme cellules modèles) pendant 30 min à 0,4 mMol/l du PCP ne donne qu'un faible effet inhibiteur, et le même résultat est obtenu après l'exposition de ces bactéries à 0,75 $\mu\text{Mol/l}$ de Cu^{2+} . Cependant la combinaison du 0,4 mMol/l du PCP et du 0,75 $\mu\text{Mol/l}$ de Cu^{2+} avait un effet bactéricide au bout de 20 min.

Parallèlement au PCP, d'autres composés organiques sont utilisés dans la préservation du bois.

- Les naphthéniques du cuivre et les carboxylases du cuivre (H. M. Barnes *et al* 2005) : ce sont de bons fongicides, ils sont plus efficaces lorsqu'ils sont utilisés avec de l'eau comme solvant.
- Des produits à bases d'azole comme le tébuconazole et le propiconazole, sont actuellement utilisés pour la préservation de bois, mais ces composés présentent une certaine toxicité pour les organismes vivants (Maria Lebkowska et al 2003).

1.5.3. Les sels métalliques.

Différents métaux possèdent des propriétés biologiques bien connues : le cuivre est fongicide l'arsenic est insecticide. Généralement les métaux sont utilisés sous forme ionique associée à un élément de rétention.

Parmi les sels métalliques utilisés dans le traitement du bois il y a :

- Le chlorure mercurique HgCl_2 , il est très actif sur les champignons et les insectes, très soluble dans l'eau, très bien fixé dans le bois. Cependant il est très corrosif vis-à-vis des métaux et il est très toxique pour les mammifères.
- Les fluorures de sodium ou de potassium : sont de bons fongicides mais de mauvais insecticides et ne résistent pas au lessivage.
- Les sels de cuivre : le sulfate de cuivre a été utilisé pour le traitement du bois vert, c'est un bon fongicide, soluble dans l'eau, mais il est corrosif pour l'acier.

- Les sels de zinc : le chlorure de zinc est un bon fongicide, mais résiste mal au lessivage.
- Les borates : ce sont de bons insecticides et fongicides, très solubles dans l'eau. Ils diffusent facilement dans le bois, mais leur résistance au lessivage est faible. Le mélange de traitement utilisé contient de l'acide borique H_3BO_4 et du borax $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$.

Le produit le plus important de cette famille est de loin les formulations à base des sels du Cuivre, du Chrome et d'Arsenic (CCA). Cette formulation constitue le produit de préservation qui a été le plus utilisé ces 50 dernières années. Par exemple, en 1995 aux USA, 90 % des produits de préservation de bois solubles dans l'eau étaient des CCA (S. N. kartal 2003)

Il existe plusieurs types de formulations de CCA (type A, B et C) pour lesquelles les proportions d'oxyde varient (Tableau 1).

Tableau 1 : Type de formulations des CCA (J.A.Hingston *et al* 2001).

Type	CuO (%)	CrO ₃ (%)	As ₂ O ₅ (%)
CCA-A	18,1	65,5	16,4
CCA-B	19,6	35,3	45,1
CCA-C	18,5	47,5	34,0

La formulation la plus utilisée est celle du type C. La rétention des CCA dans le bois varie de 4 à 40 kg/ m³ selon l'utilisation. Un bois utilisé dans la construction (fondations par exemple) ou immergé dans l'eau de mer nécessite un taux de rétention élevé (H.M.Solo-Gabriele *et al* 2002).

Les CCA sont extrêmement efficaces contre les champignons lignivores, les insectes xylophages et les térébrants marins. Elles protègent le bois mis en service dans des classes de risques élevées (classes 4 et 5). Cependant, ces éléments métalliques, qui, en faible quantité sont nécessaires pour la vie, peuvent se révéler très nocifs s'ils sont présents en quantités très importantes. Ainsi, l'arsenic est un élément cancérigène par dégradation de l'ADN (S. Raisuddin et A. N. Jha 2004), sa présence a aussi un effet néfaste sur la croissance des plantes (M. Mkandawire *et al* 2004). La présence du Chrome (Cr +III et Cr +VI) diminue la concentration de la chlorophylle et l'activité enzymatique des plantes par substitutions du Fe^{2+} (N. Pandey et C. P. Sharma 2003). La réduction du Cr +VI en Cr +III s'accompagne d'une libération des radicaux libres qui dégradent l'ADN par oxydation (C. Cerventes *et al* 2001).

De son côté, le Cu^{2+} inhibe la croissance des plantes et celle des germes, il dégrade la chlorophylle et inhibe la croissance des racines (Z. T. Xiong et H. Wang 2004). À cause de cette toxicité, l'agence américaine pour la protection de l'environnement a interdit, à partir de janvier 2004, l'utilisation des CCA dans le traitement du bois utilisé pour la construction des maisons (S. A. Katz et H. Salem 2005).

Au problème de la toxicité s'ajoute celui de la gestion des déchets du bois traité par les CCA et arrivé en fin de service. La combustion de ces déchets étant écartée, à cause de la génération des gaz toxiques, plusieurs solutions pour la décontamination de ces bois ont été proposées. Par exemple, S. N. Kartal (2002) a proposé l'extraction des CCA par l'utilisation de l'EDTA, d'autres extractions sont faites avec des méthodes chimiques ou avec des bactéries (C. A. Clausen 2000, R. Belalia et S. Grelier 2002). Cependant, le passage à l'échelle industrielle de ces techniques reste à faire.

1.5.4. Alternatives.

Les conditions environnementales de plus en plus sévères pèsent actuellement très lourdement sur le développement de nouveaux produits de préservation. Ces dernières années ont vu la disparition de nombreux biocides et l'interdiction totale ou partielle de certaines familles de produits très performantes, comme les créosotes ou les pentachlorophénol. L'utilisation des produits en phase aqueuse comme les CCA est également très controversée, alors qu'il n'existe à ce jour pas de substitut à ce type de substance.

Beaucoup de produits de remplacement ont été proposés. Des formulations à base de cuivre, chrome et fluor (CCF), de cuivre, chrome et phosphore (CCP), de cuivre, chrome et bore (CCB) ou à base d'arséniate, cuivre ammoniacal (ACA) sont commercialisés depuis plusieurs années et se montrent efficaces. Cependant, ces formulations utilisent toujours le chrome et le cuivre, ce qui conduira à leur abandon progressivement.

Une alternative consiste à utiliser des produits de préservation à base de bore, qui est un bon fongicide et insecticide tout en étant peu toxique pour l'être humain. Cependant sa faible résistance au lessivage limite son utilisation à des classes de risque présentant une faible exposition à l'humidité (classe 1 et 2). Pour améliorer cette résistance du bore au lessivage P. Souloungounga (2002) a utilisé le glycérol et le glyoxal pour sa fixation.

R.J.A Gosselink *et al* (2004) ont utilisé un traitement thermique à 275 °C pendant 15 min. Ce bois carbonisé présente une grande résistance aux attaques fongiques (perte de masse de 4 % après 2 ans d'essais de champs). Cependant cette carbonisation entraîne une perte dans les

propriétés mécaniques suite à la dégradation de la cellulose. K. Voda *et al* (2003), ont proposé l'utilisation des composés aromatiques des huiles essentielles comme agent antifongique. Cette étude a montré que des composés comme le thymol, carvacrol et cuminaldéhyde (Figure 9) présentent une grande efficacité contre *Coriolus versicolor* et *Coniophora puteana* avec des concentrations d'inhibitions minimales de quelques mMol/l.

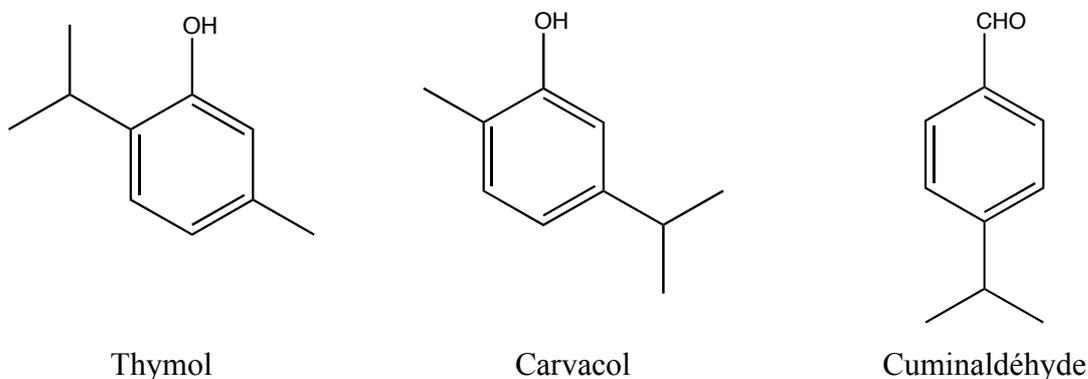


Figure 9 : Structure chimique du Thymol, du Carvacrol et du Cuminaldéhyde (K. Voda *et al* 2003).

A. Mabicka *et al* (2005) ont montré que l'association du 2-hydroxypyridine-N-oxide, l'EDTA et l'irganox 1076 permet d'avoir une protection totale du bois contre *Coriolus versicolor* après 16 semaines d'incubation. F. S. Nakayama *et al* 2001 ont proposé l'utilisation de résine de Guayule, plante très résistante aux attaques fongiques et aux champignons, dans la préservation du bois. S. Palanti et D. Susco (2004) ont utilisé comme produit de préservation du bois un mélange d'huile et du tébuconazole ou du propiconazole. La concentration du biocide était de 0,056 % (m/m). Les résultats obtenus montrent qu'avec un taux de rétention d'huile de 513 kg/m³, le bois présente des pertes de masse inférieures à 5 %, après exposition aux *C.versicolor* et *P. placenta*. Cependant, la préservation du bois dans ce cas n'est due qu'au caractère hydrophobe des huiles utilisées car avec une rétention en huile de 81 kg/m³, la perte de masse était de l'ordre de 26 % avec *P. placenta*.

Chapitre 2. Préservation des aliments et caractères physiologiques des souches étudiées.

2.1. Préservation - sécurité sanitaire des aliments.

Depuis ces dix dernières années dans le domaine de l'agroalimentaire, la sécurité sanitaire des aliments est la priorité de nombreux programmes ou thématiques de recherche. La législation actuelle impose à l'industriel de mettre en place un certain nombre de mesures pour garantir la qualité et l'innocuité du produit alimentaire. Ces garanties sont de plus en plus difficiles à assurer avec un éloignement des centres de consommation par rapport aux centres de production. Cette mondialisation des circuits alimentaires complique la tâche de l'industriel qui doit non seulement garantir un produit sain exempt de toute contamination bactérienne, mais également un aliment organoleptiquement stable pendant toute la durée de conservation. Les dernières intoxications alimentaires par des bactéries pathogènes comme *Listeria* ou *Salmonella*, montrent bien cette difficulté de garantir un aliment totalement sain malgré une volonté et des prises d'initiatives accrues dans le domaine de la sécurité alimentaire.

Cette difficulté est due à une multiplication des sources de contamination primaires (air, sol, eau et matières premières) et secondaire (hommes, machines), à des modes de consommation de plus en plus complexes, à des durées limites de conservation de plus en plus longues....

Plusieurs outils sont actuellement utilisés pour améliorer la sécurité alimentaire, souvent intégrés dans un programme HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) pour ce qui est du nettoyage des canalisations et des surfaces de travail par des antiseptiques et des désinfectants. La préservation des aliments est également obtenue par des moyens complémentaires comme la décontamination thermique (thermisation, pasteurisation et stérilisation), la diminution de l'activité de l'eau (séchage, salaison ou concentration), la mise en œuvre d'atmosphères modifiées, etc. Enfin, l'utilisation de conservateurs pouvant directement agir sur l'aliment comme les acides carboxyliques et leurs sels (acétique, propénoïque, lactique), les enzymes comme le lysozyme, ou les bactériocines, sont couramment employés.

Cependant, malgré tous ces efforts, on enregistre toujours des cas d'intoxications alimentaires qui peuvent être fatales dans certains cas, comme pour la listériose (Tableau 2) et la salmonellose (Figure 10).

Les emballages actifs et en particulier les emballages antimicrobiens peuvent ainsi constituer un outil complémentaire aux autres moyens pour la préservation des aliments.

Tableau 2 : Principales caractéristiques des cas de listériose identifiés par la DO et le CNR des *listeria* en France entre 1999-2003 (Institut national de veille sanitaire).

		1999	2000	2001	2002	2003
France entière	Cas déclarés par la DO	269	263	188	220	209
	Cas avec souche transmise au CNR	254	250	186	218	199
France métropolitaine		261	257	183	214	202
Incidence (/1 million d'habitants)		4,5	4,4	3,1	3,6	3,4
Forme	non Materno-néonatale	202	199	144	165	162
	Materno-néonatale	67	64	44	55	47
mortalité	décès adulte	47	34	46	35	26
	mortalité néonatale et foetale	19	23	13	22	13
	total décès	66	57	59	57	39
Forme non Materno-néonatale						
Terrain	sans pathologie sous-jacente	32	32	16	27	26
	terrain à risque	140	130	107	113	117
	autre pathologie	20	32	18	22	16
	terrain inconnu	10	5	3	3	3
Sexe	féminin	78	74	55	70	73
	masculin	124	125	89	95	89
Sérovar	% sérovar 4b	51	54	42	56	47
	% sérovar 1/2a	24	30	33	22	27
	% sérovar 1/2b	29	13	22	17	22
	% sérovar 1/2c	5	3	3	3	5

DO: Déclaration obligatoire.

CNR: Centre national de référence des listeria.

Materno-néonatale : Femme enceinte, un avortement, un nouveau-né mort-né, un nouveau né de moins d'un an.

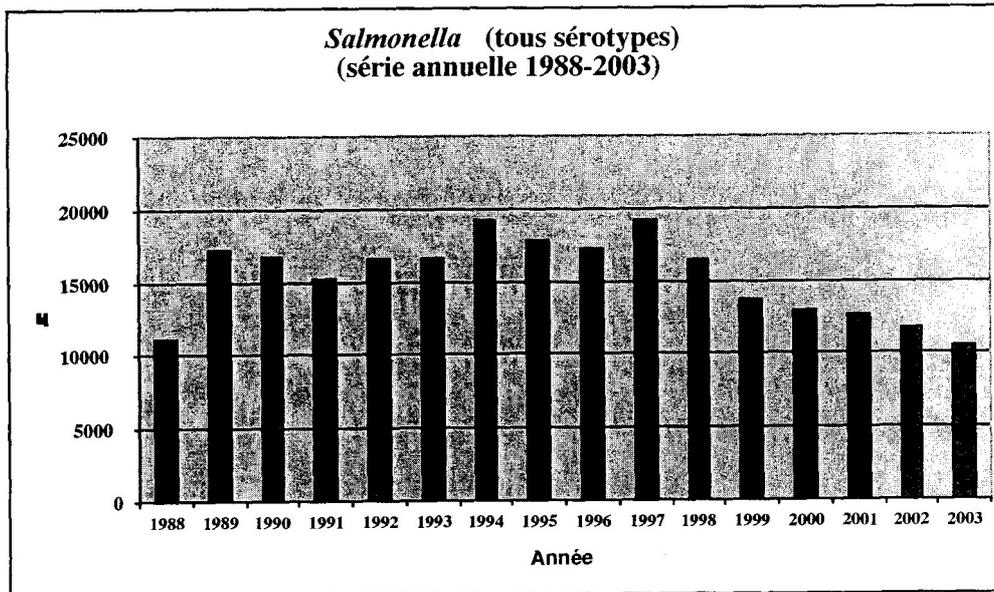


Figure 10 : Évolution du nombre de Salmonella portés à la connaissance du Centre National de Référence des *Salmonella* en France entre 1988 et 2003.

2.2. Caractères physiologiques et pathologiques des souches étudiées : *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium*

2.2.1. Caractères généraux des *Listeria*.

2.2.1.1. *Morphologie et structure.*

Les cellules de *Listeria* sont des bâtonnets courts et réguliers, de 0,4-0,5 μm de diamètre et 0,5-2 μm de longueur, avec des extrémités arrondies. Les cellules sont isolées ou groupées en courtes chaînes.

Les *listeria* sont non-acido-alcoolo résistantes, sans capsule ni spore, mobiles par quelques flagelles péritriches, si la culture est réalisée à 20-25 °C.

Ces bactéries sont aérobies et anaérobies facultatives à Gram positif. Les colonies (de 24 à 48h d'incubation) sur gélose nutritive ont un diamètre de 0,5 à 1,5 mm.

La température optimale de croissance est de 30 à 37 °C. Les températures limites de croissance varient de 1 à 45 °C. La croissance est possible à pH variant entre 6 et 9, en présence de 10 % (m/V) de NaCl. Certaines souches supportent 20 % de NaCl.

Une température de 60°C est suffisante pour une destruction totale et rapide. Toutefois, la composition du milieu, le pH et l'état physiologique sont autant de paramètres qui modifient

la thermosensibilité de la souche. La bactérie s'adapte au stress thermique en modifiant la composition biochimique de sa membrane.

Le genre *Listeria* est constitué de deux branches distinctes. L'une comprend notamment *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, la seconde comprenant uniquement *L. grayi*.

Parmi ces six espèces deux sont naturellement pathogènes : *L. monocytogenes* pour l'homme et les animaux et *L. ivanovii* seulement chez les animaux et presque toujours sous forme d'avortement.

Les *Listeria* sont présentes au niveau du sol et de la végétation, ainsi que chez des porteurs sains. Elles sont isolées des plantes, des fourrages, de la boue et des eaux de rivières.

2.2.1.2. Pathologie humaine : toxi-infection alimentaire (*L.monocytogenes*).

Les risques de maladie sont fonction autant de la nature du micro-organisme que de l'état physiologique de la personne infectée. Les personnes à risques sont principalement les personnes ayant un système immunitaire fragile, comme les femmes enceintes et les populations jeunes ou âgées.

Les causes des intoxications sont par ordre d'importance : la mauvaise réfrigération, la consommation d'aliments crus ou insuffisamment cuits, la consommation de produits périmés et enfin la consommation des aliments souillés par des surfaces de travail ou les outils mal désinfectés.

Les principaux aliments mis en cause dans les intoxications par *L. monocytogenes* sont la charcuterie, les produits de la mer, le lait et ses produits dérivés.

Les symptômes sont souvent : diarrhée, crampe abdominale, nausée et fièvre, pour les cas bénins, et des septicémies ou méningites pour les cas plus graves.

La listériose est en France une maladie à déclaration obligatoire (Décret N° 98-69 du 13 mars 1998).

2.2.2. Caractères généraux des *Salmonella*.

2.2.2.1. Morphologie et structure.

Les salmonella sont des bacilles de 0,7 à 1,5 µm de diamètre sur 2 à 5 µm de long. Ces bactéries sont mobiles à l'état frais, cependant des mutants immobiles existent tel que *S. gallinarum*.

Ces bactéries ne forment pas de spore et la constitution de leur paroi est typique de celle des bactéries Gram négatif (Figure 11). Elle est constituée d'un ensemble de couches de

peptidoglycane et d'une membrane externe fixée aux peptidoglycane par l'intermédiaire de lipoprotéines. Cette membrane est plus sélective que celle des bactéries Gram positif.

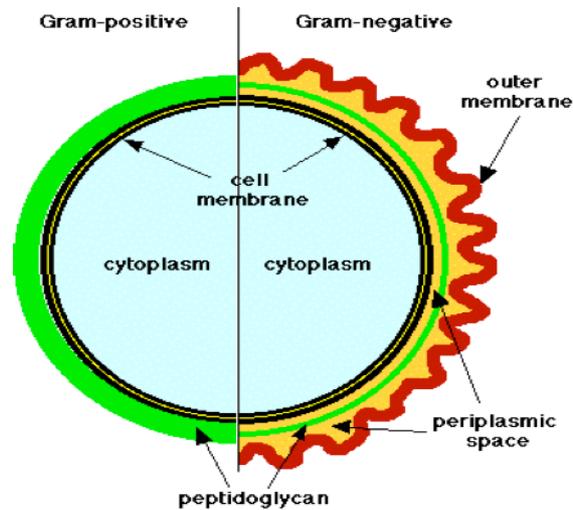


Figure 11 : Schématisation de la paroi cellulaire d'une bactérie Gram positif et d'une bactérie Gram négatif.

Les Salmonella sont des bactéries anaérobies facultatives, elles se cultivent bien sur milieu gélosé nutritif et forment généralement (en 18-20 h d'incubation) des colonies de 2 à 4 mm de diamètre.

La température optimale de croissance se situe entre 35 et 37 °C. La croissance est nettement retardée par les températures inférieures à 10 °C. La survie est possible entre 5 °C et 45 °C.

Les salmonella sont capables de survivre à des pH compris entre 4,1 et 9 avec un optimum pour la croissance de 6,5 à 7,5. Elles se développent bien pour des valeurs d'activité d'eau comprises entre 0,93 et 0,99.

La plupart des aliments constituent d'excellents milieux de culture pour les Salmonella.

2.2.2.2. Pathologie humaine.

S. typhimurium affecte à la fois l'homme et les animaux, et provoque des gastro-entérites de sévérité variable et plus rarement des septicémies ou des infections localisées.

La fièvre typhoïde encore appelée fièvre entérique est une infection septicémique aiguë. La durée de l'incubation varie de 3 à 60 jours suivant l'état du sujet et suivant la taille de l'inoculum.

Des complications apparaissent dans 26 % des cas et se manifestent différemment suivant les individus : coagulation intravasculaire disséminée, atteinte du système nerveux central

entraînant la mort, mais aussi des complications digestives (hémorragies intestinales et perforations), hépatiques, et urinaires.

Chapitre 3. Quelques généralités sur les bioemballages actifs.

Afin de réduire le volume de déchets des matériaux des emballages synthétiques à base de polymères d'origine pétrochimique (polyéthylène PE, polystyrène PS, polyvinylchloride PVC, ...) qui posent un problème environnemental, l'élaboration de nouveaux emballages comestibles ou biodégradables à usage alimentaire constitue une alternative très intéressante. À la différence des nombreux matériaux d'emballage synthétiques produits actuellement, posant à la fois des problèmes de non-biodégradabilité et de non-renouvellement des matières premières, les biomatériaux sont élaborés à partir de macromolécules d'origine naturelle, ou biopolymères, qui sont à la fois biodégradables et renouvelables.

3.1. Les biomatériaux ou bio-emballages.

Les biopolymères potentiellement utilisés pour l'élaboration de bio-emballages peuvent être classés en quatre catégories :

- Les polysides (celluloses et dérivés, amidons et dérivés, ...)
- Les protéines (gélatine, gluten, ...)
- Les composés lipidiques (cires, acides gras et dérivés, ...)
- Les polyesters (poly- β -hydroxybutyrate PHB ou valérate PHV, poly(acide lactique)).

À titre d'exemple, le Tableau 3 compare certaines propriétés physiques et physico-chimiques de matériaux d'emballages synthétiques type polyéthylène et de bioemballages.

Tableau 3 : Comparatif des propriétés physiques des différentes catégories d'emballages (Mathlouthi 1996).

	<i>Propriétés mécaniques</i>	<i>Propriétés optiques</i>	<i>Solubilité dans l'eau</i>	<i>Propriété barrière à la vapeur d'eau</i>
Polymères synthétiques	<i>Bonnes</i>	<i>Bonnes</i>	<i>Faible</i>	<i>Bonne</i>
Polyosides	<i>Bonnes</i>	<i>Bonnes</i>	<i>Grande</i>	<i>Faible</i>
Protéines	<i>Bonnes</i>	<i>Bonnes</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Faible</i>
Composés lipidiques	<i>Faibles</i>	<i>Faibles</i>	<i>Faible</i>	<i>Bonne</i>
Polyesters	<i>Moyennes</i>	<i>Moyennes</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Bonne</i>

Quelle que soit la catégorie, les biopolymères sont en général moins stables que les polymères synthétiques avec une sensibilité à la dégradation microbienne, à l'oxydation (rancissement pour les composés lipidiques), et à l'humidité.

Les emballages à base de polymères lipidiques et de polyesters sont opaques avec des propriétés mécaniques médiocres. Mais ces emballages présentent de bonnes propriétés barrières à la vapeur d'eau.

Les emballages à base de polysides et de protéines présentent de bonnes propriétés tant mécaniques (force à la rupture et pourcentage d'élongation) qu'optiques (transparence). Toutefois, leur sensibilité à l'eau est leur principal handicap.

Parallèlement à l'ensemble des propriétés physiques présentées ci-dessus, le bioemballage doit être en accord avec les exigences spécifiques du produit qu'il emballe.

Rappelons ici le principal mode de formation des bioemballages est le casting. Dans la suite de ce travail nous avons été amené à étudier certaines propriétés physico-chimiques des matériaux à base d'HPC.

3.1.1. Formation et propriétés des bioemballages.

3.1.1.1. *Fabrication des films par voie humide (casting).*

La formation des films par voie humide repose sur la séparation du polymère filmogène de la phase solvant par précipitation ou changement de phase sous l'effet de l'élimination par évaporation du solvant. La formation du film est le résultat de l'augmentation de la concentration en polymère, entraînant l'agrégation des molécules et la formation d'un réseau tridimensionnel. Ce procédé, parfaitement maîtrisé et appliqué en laboratoire, nécessite l'étalement de la solution en couche mince (casting). Les propriétés des films formés par voie humide sont dépendantes des conditions de fabrication, humidité relative, vitesse et température de séchage.

3.1.1.2. *Résistance des films à l'immersion dans l'eau.*

La résistance des films à l'immersion dans l'eau dépend de la nature et de la densité des interactions stabilisant le réseau. Ainsi la solubilité du film diminue avec l'importance du nombre de liaisons covalentes qui figent le film et empêchent sa déstructuration.

La solubilité dans l'eau est une propriété importante qui conditionne l'application potentielle des matériaux. Des films à faible solubilité dans l'eau sont nécessaires pour la protection d'aliments à forte teneur en eau. Les films hydrosolubles sont intéressants pour des applications dans les domaines des emballages comestibles ou micro-encapsulation.

De façon générale, les bioemballages à base de dérivés cellulosiques sont relativement hydrosolubles. Cette propriété peut être diminuée par la mise en œuvre de liaisons intermoléculaires covalentes (Zhou *et al* 1995) ou par association de polymères à solubilité différente et addition de composés moins hydrophiles (H. Moller *et al* 2004, Fimbeau *et al* 2006).

3.1.1.3. *Plastifiants.*

Les plastifiants ont essentiellement la fonction d'améliorer les propriétés mécaniques. Ce sont en général des substances de faibles poids moléculaire destinées à réduire les liaisons faibles inter-chaînes, conduisant à une plus grande flexibilité et extensibilité des matériaux.

A titre d'exemple, le polyéthylène glycol, sorbitol, glycérol sont couramment utilisés dans les emballages à base de cellulose (Debeaufort et Voilley 1995, Kim et Ustunol 2001).

3.1.1.4. *Propriétés mécaniques.*

Pour maintenir son intégrité, un emballage doit être capable de résister aux contraintes imposées pendant le transport, le stockage et la distribution des produits alimentaires. Les propriétés mécaniques sont largement associées à la distribution et à l'intensité des interactions inter et intra-chaînes.

D'une manière générale, lorsque les liaisons covalentes stabilisent le réseau ou lorsque la densité d'énergie est importante, les bioemballages sont résistants et rigides. Au contraire, lorsque les interactions sont en majorité de faible énergie, les films sont largement déformables.

Les propriétés dépendent aussi des conditions de fabrication (vitesse de séchage, température) de leur composition (plastifiants, lipides) et de la nature des solvants (Yang et Paulson 2000, Debeaufort *et al* 2000, Kestler et fennema 1989).

3.1.1.5. *Propriétés barrières à la vapeur d'eau.*

La perméabilité à la vapeur d'eau est un paramètre déterminant pour garantir les qualités organoleptiques du produit alimentaire et lutter contre les phénomènes de déshydratation ou de réhydratation.

Le caractère hydrophile de la majorité des bioemballages et notamment ceux élaborés à base de polysaccharides explique leurs faibles propriétés barrières à la vapeur d'eau. L'utilisation de lipides (acides gras et dérivés) sous forme d'émulsion ou de bicouches permet de diminuer

leur hydrophilie des membranes et réduire ainsi leur coefficient de transfert à la vapeur d'eau (CTVE).

Avant d'aborder le thème des emballages actifs, quelques caractéristiques principales des matériaux élaborés à base de polysaccharides sont présentées ci-dessous.

3.1.2. Les biopolymères osidiques.

3.1.2.1. L'amidon.

L'amidon, abondant, renouvelable, biodégradable et peu cher peut être extrait des céréales, du riz et des pommes de terre avec des rendements moyens de 60 %. C'est un mélange d'amylose, polymère d'unités glucose unis par des liaisons α -1,4, linéaire et souvent en configuration hélicoïdale et d'amylopectine très ramifiée. L'amylopectine contient une partie linéaire formée d'unités glucose liées en α -1,4, mais également des ramifications faisant jouer des liaisons α -1,6 toutes les 25 unités glucose en moyenne de la chaîne principale (Figure 12).

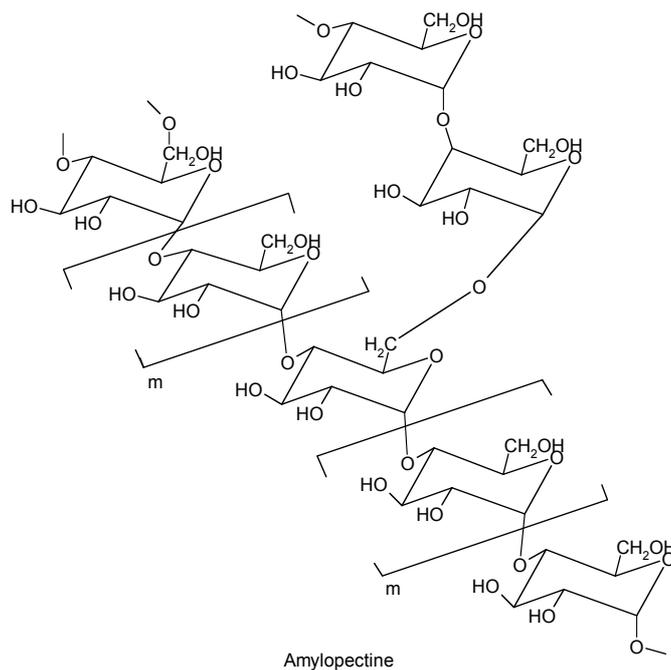


Figure 12 : Structure chimique de l'amylopectine

La part de chacun des deux constituants varie avec l'origine végétale (Tableau 4)

Tableau 4: Teneurs en amylose et en amylopectine d'amidons naturels

	<i>Amylose (%)</i>	<i>Amylopectine (%)</i>
<i>Pomme de terre</i>	23	77
<i>Blè</i>	20	80
<i>Riz</i>	15 à 35	65 à 85
<i>Maïs</i>	25	75
<i>Banane</i>	17	83

L'amylose est à l'origine des propriétés filmogènes. Les films d'amidon sont transparents et thermoplastiques avec des pourcentages de cristallinité variables. La cristallinité du matériau est due à l'amylose et aux régions linéaires de l'amylopectine, qui s'organisent en hélice engendrée par des liaisons hydrogène intermoléculaires entre fonctions hydroxyle. La région ramifiée de l'amylopectine constitue plutôt une structure amorphe (Mathlouthi, 1996). Les propriétés filmogènes de l'amidon sont fonction du poids moléculaire moyen, des parts en amylose/amylopectine et donc du ratio cristallin/amorphe.

La résistance mécanique des films d'amidon est appréciable, avec des propriétés barrières aux gaz modérées en conditions sèches. L'amidon est surtout utilisé pour faire des emballages rigides et de courte durée de vie du fait de sa sensibilité à l'humidité. Les amidons natifs trouvent des applications en agroalimentaire (boîtes à œufs, films de paillage agricole).

Mais ce n'est qu'après modification physique, chimique ou enzymatique que l'amidon trouve ses principales applications : cosmétiques, colles, agroalimentaires (épaississant) ...

3.1.2.2. *Matériaux à base de cellulose et dérivés.*

La cellulose est un homopolymère linéaire composé d'unités D-anhydrogluco-pyranose unies par des liaisons glucosidiques β -1,4. Elle est également qualifiée de polymère de cellobiose : deux unités glucose. La cellulose est extraite du bois des arbres supérieurs ou du coton à plus de 10^{11} - 10^{12} tonnes/an dans le monde. Aux niveaux des végétaux supérieurs, les résineux ont des longueurs de fibres 2 à 3 fois plus longues que celles des feuillus. Le choix de l'origine de la cellulose peut moduler les propriétés mécaniques du film fabriqué.

La cellulose est obtenue par digestion mécanique ou thermomécanique (broyage) et chimique (cuisson) du bois pour éliminer essentiellement la lignine selon les procédés sulfite acide ou Kraft basique.

La solubilité dans l'eau diminue dès que le degré de polymérisation (DP) dépasse 6. Industriellement, le coton présente un DP moyen supérieur à 2500 et la pâte à papier d'Épicéa

ou de Hêtre a un DP de 600-1700. La résistance mécanique (élasticité et force à la rupture) est fonction notamment de la longueur des fibres (DP).

La structure cristalline est due à une organisation en hélice maintenue par des liaisons hydrogène entre les O-3-H et O-5' et entre O-2-H et O-6'. La cellulose est thermostable avec une température de dégradation supérieure à 230°C. L'organisation des fibres de cellulose donne une structure poreuse. La cellulose est un produit incolore, blanc en solution, sans odeur et non-toxique.

Pour améliorer sa solubilité dans l'eau, la cellulose peut être estérifiée ou étherifiée au niveau des fonctions hydroxyle libre pour aboutir à certains produits commercialisés comme l'acétate de cellulose, le méthyle ou l'éthyle de cellulose (Hjærtstam *et al.*, 1999 ; Ayranci *et al.*, 2001; De la Cruz *et al.*, 2001 ; Turham *et al.*, 2001), l'hydroxypropylcellulose, ou l'hydroxypropylméthylcellulose (produit HERCULES[®], Aqualon) ...

Les dérivés de la cellulose sont souvent solubilisés dans des mélanges eau/éthanol pour diminuer les temps de séchage du film. La formation des films peut être effectuée par casting (De la Cruz *et al.*, 2001; Turham *et al.*, 2001) ou par pulvérisation sur une surface plane (Hjærtstam *et al.*, 1999). Le procédé de fabrication, la composition de la solution filmogène et la nature de l'émulsion et de l'émulsifiant déterminent les propriétés physiques des films. Certains auteurs ont montré que l'hygroscopie des films de méthylcellulose varie en fonction du taux de substitution des fonctions hydroxyle libre de la cellulose et la résistance mécanique augmente avec la diminution des fonctions OH (Hjærtstam *et al.*, 1999). L'hygroscopie dépend également de la température et de la nature du substituant sur la fonction OH (De la Cruz *et al.*, 2001). Enfin, l'addition de lipides permet d'augmenter l'hydrophobicité des films à base de dérivés de cellulose et de réduire le coefficient de transfert à la vapeur d'eau (Ayranci *et al.*, 2001, Moller *et al* 2004).

** Cas particulier de l'Hydroxypropylcellulose (HPC).*

L'HPC est un éther de cellulose hydrosoluble, non-ionique. Il associe une bonne solubilité dans les solvants organiques, une thermoplasticité et une tensioactivité.

La production de l'HPC est réalisée par une activation de la cellulose en milieu basique avec NaOH, avant l'introduction de substituant sous forme d'hydroxypropyle.

La Figure 13 représente la structure idéalisée d'un fragment de molécule d'HPC de substitution molaire (MS) égale à 3,0.

Le degré de substitution de l'HPC peut être déterminé par chromatographie en phase gazeuse (C. A. Lorenzo *et al* 2000), par RMN ^{13}C (C. A. Lorenzo *et al* 2000), par RMN ^1H (S. Richardson *et al* 2003).

L'HPC est soluble dans l'eau à température ambiante, insoluble au-dessus de 45°C , et soluble dans de nombreux solvants organiques à chaud ou à froid (comme l'éthanol).

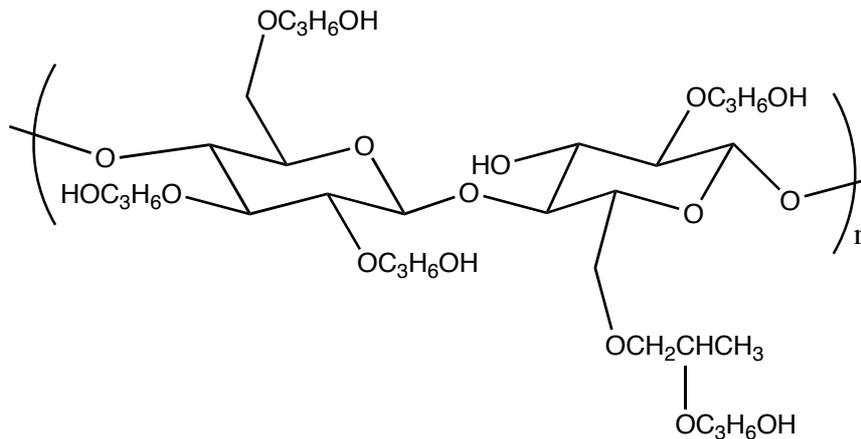


Figure 13 : Structure théorique idéale de l'HPC.

L'HPC présente d'excellentes propriétés filmogènes, ce qui fait de ce polymère un matériau couramment utilisé pour la fabrication des films, revêtements de papier, textiles. Les films d'HPC sont caractérisés essentiellement par un grand module d'élasticité (P. L. Almeida *et al* 2002, J.P.Borges *et al* 2004).

Les films d'HPC absorbent l'humidité comme tous les matériaux hydrosolubles, ce qui leur confère de mauvaises propriétés barrières à la vapeur d'eau. La quantité absorbée dépend en premier lieu du degré de substitution (C.B.McCrystal *et al* 1999), mais elle dépend aussi de l'humidité relative et de la température.

L'HPC est physiologiquement inerte, elle est utilisée en agroalimentaire comme stabilisant, en cosmétique comme épaississant et stabilisant d'émulsion, dans l'industrie pharmaceutique comme enrobage des comprimés, comme formulations à libération retardée dans les lotions et émulsions médicales.

3.2. Les emballages actifs.

3.2.1. Les différents types d'un emballage actif.

Les emballages actifs peuvent être classés en trois grande catégories, selon qu'ils réagissent aux conditions de conservation ou aux caractéristiques de l'aliment pour en informer le consommateur, ou qu'ils agissent sur l'aliment pour faciliter sa consommation, voire qu'ils agissent sur l'aliment pour améliorer ou préserver sa qualité jusqu'à sa consommation.

- *Emballage indicateur.*

Ces emballages donnent des informations sur le produit ou sur ses conditions de conservation. Les plus connus et les plus utilisés sont les indicateurs « temps - température » dont la couleur varie avec les conditions de stockage ou de traitement du produit frais ou transformé. Certains de ces indicateurs prennent en compte l'histoire cumulée temps – température, alors que d'autres n'indiquent que le dépassement d'une température critique de façon réversible ou non. Dans le premier cas, des indicateurs du type TTI « Time Temperature Indicators » sont utilisés pour valider un procédé thermique (stérilisation, pasteurisation...). Ils sont essentiellement basés sur des réactions de type enzymatique ou de polymérisation de monomères acétyléniques. Dans le second cas, des indicateurs du type TI « Temperature Indicators » sont utilisés pour garantir au consommateur que le produit n'a été en aucun cas exposé à une température préjudiciable, notamment pour les produits frais ou congelés, ils sont basés sur l'utilisation d'encre thermo-chromique.

- *Emballage préparateur.*

Qualifiés également d'emballages cuisiniers, ils n'offrent d'utilité qu'au moment de la consommation de l'aliment. Leur action est liée aux conditions de préparations des aliments. Comme exemple de ce type d'emballage, il y a les emballages auto-chauffants et auto-refroidissants.

La mise au point de suscepteurs destinés au chauffage par micro-ondes a beaucoup participé au développement de ce type d'emballage. Le suscepteur permet de transformer partiellement, en surface, la puissance électromagnétique en énergie thermique, ce qui améliore l'homogénéité du chauffage en évitant les points chauds.

- *Emballage interactif.*

Les emballages interactifs sont des emballages qui agissent sur l'aliment. Leur objectif est de préserver la qualité du produit en créant ou en maintenant des conditions optimales pour sa conservation (N.Gontard 2000). Tous les mécanismes de détérioration des aliments sont visés par l'action de ces emballages : oxydation des matières grasses, brunissement, dégradation des vitamines, développement des micro-organismes, activité respiratoire des végétaux frais, etc. Ils pourront par exemple, assurer une composition gazeuse optimale à l'intérieur de l'emballage par perméabilité sélective vis-à-vis de l'oxygène, du dioxyde de carbone, d'éthylène et de vapeur d'eau, ou bien avoir un effet anti-microbien par addition d'agent anti-microbien autorisé en tant qu'additif alimentaire.

Plusieurs types d'emballages interactifs existent : absorbeurs d'oxygène, absorbeurs d'humidité, absorbeurs d'odeurs, absorbeurs d'éthylène, générateurs du CO₂, générateurs d'éthanol. Le Tableau 5 regroupe quelques exemples d'emballages actifs commercialisés.

Tableau 5 : Quelques exemples de système d'emballages interactifs commerciaux (Coma, 2001).

Emballages actifs <i>Interactifs</i>
<p>Absorbeurs d'oxygène : <i>Sachet absorbeurs (Mitsubishi Gas Chemical Co.-Japan, Multiforme dessicant - USA., Standa - France.)</i></p> <p>Le plus connu et le plus ancien repose sur l'oxydation du fer en milieu hydraté. Les applications concernent le conditionnement sous atmosphère modifiée et la conservation de produits sensibles à l'oxydation et à la croissance microbienne aérobie.</p>
<p>Absorbeurs de CO₂ : <i>Sachet absorbeurs (Mitsubishi Gas Chemical Co.-Japan)</i></p> <p>Certains absorbeurs sont constitués par de l'oxyde de calcium associé à du silicagel. Ses applications concernant le conditionnement sous atmosphère en grande majorité.</p>
<p>Absorbeurs d'éthylène : <i>(ExtendalLife Systems Hayward - USA, Peak Fresh product, Australie.)</i></p> <p>Basés sur l'oxydation de l'éthylène par du KM_nO₄, ses applications sont la conservation de fruits climactériques.</p>
<p>Générateurs de CO₂ : <i>(Air liquide, France)</i></p> <p>Par sublimation, ils sont très utilisés dans le domaine de la conservation sous atmosphère modifiée permettant de lutter contre le transfert de CO₂ à travers le film et contre la dépression dans l'emballage après mise sous atmosphère.</p>
<p>Générateurs d'éthanol : <i>(Freund Industrial Co. - Japon)</i></p> <p>Pouvant être constitués de silicagel et d'éthanol, ils libèrent progressivement de l'alcool dans l'atmosphère interne pour lutter contre la croissance fongique. Ils améliorent également les qualités organoleptiques de certains produits.</p>

<p>Absorbants d'humidité ou d'eau liquide : Films absorbants (Airsec - France, Magic - France) Le silicagel reste le composé le plus utilisé pour la protection de produits sensibles à l'humidité et sensibles au développement microbien. Des polymères hydrophiles absorbants sont aussi utilisés pour l'absorption d'exsudats.</p>
<p>Absorbants d'odeurs : Sachets absorbants (Multisorb technologies - USA) C'est le charbon actif qui est le plus utilisé et son emploi vise les produits à fort potentiel aromatique, les aliments deshydratés et ceux sensibles ou confrontés lors du stockage à la contamination par des odeurs étrangères</p>
<p>Systèmes mixtes Différents systèmes mixtes peuvent être rencontrés sur le marché, associant des absorbants de composés et des émetteurs d'inhibiteurs, s'adaptant ainsi aux risques premiers d'altération des denrées alimentaires Ex Absorbants d'eau et émetteur de CO₂, (Codimer - France)</p>
<p>Matériaux à perméabilité sélective pour la conservation sous atmosphère modifiée : (Ideal fruits, Bolloré technologies - France)</p>
<p>Anti-microbiens:</p> <ul style="list-style-type: none">- Les zéolites (Mitsubishi - Japon)- Composés organiques tels les acides organiques- Greffage de benomyl (Dupont compagny)

3.2.2. Emballages anti-microbiens.

Pour répondre à la demande de sécurité alimentaire les emballages anti-microbiens ont connu un développement très important ces dernières années.

Les emballages anti-microbiens peuvent être classés en cinq catégories (Tableau 6), qui sont fonction du mode de fixation de l'agent antimicrobien et de la nature de ce dernier.

- Addition de sachets qui contiennent l'agent anti-microbien.
- Incorporation de composés actifs directement dans le support.
- Enrobage du support avec un agent anti-microbien.
- Immobilisation d'un l'agent anti-microbien dans une matrice par des liaisons covalentes ou ioniques .
- Utilisation de polymère ayant une activité anti-microbienne.

Tableau 6 : Quelques exemples d’emballage antimicrobien.

Type d’emballage	Composé antimicrobien	Micro-organisme cible	Support	Références
Incorporation de l’agent antimicrobien	Hexaméthylène tétramine (HMT)	Bactéries lactiques	Polyéthylène à faible densité (LDPE)	F.Devlieghere <i>et al</i> 2000
	Nitrite de sodium	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus niger</i>	LDPE	Jari Vartiainen <i>et al</i> 2003
	Propionate de sodium	Moisissures	Acétate de cellulose	N.F.F Soares <i>et al</i> 2002
	Chitosane	<i>Listeria monocytogenes</i>	HydroxylPropylMéthylCellulose	H.Moller <i>et al</i> 2004
	Nisine	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	HPMC	Sebti <i>et al</i> 2002,
Enrobage du support par l’agent antimicrobien	Nisine	<i>Micrococcus flavus</i> <i>Listéria monocytogenes</i>	Papier Plastique Cellulose et dérivés	Chan Hoo Lee <i>et al</i> 2003
Immobilisation de l’agent antimicrobien dans le support ou Biopolymères actifs	Lysozyme	<i>Micrococcus Lysoleiktius</i>	Triacide de cellulose	P.Appendini et J.H.Hotchkiss 1997
	Nisine	<i>Micrococcus luteus</i>	HPMC	Sebti <i>et al</i> 2003
	Chitosane	<i>L.monocytogenes</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	Chitosane	Coma <i>et al</i> 2003

- *Addition de sachets avec des agents anti-microbiens dans le support.*

Dans cette catégorie, les systèmes à action anti-microbienne indirecte comme les absorbeurs d’oxygène et d’humidité ou les générateurs de dioxyde du carbone sont les plus utilisés.

Les absorbeurs d’oxygène et d’humidité ont été utilisés en premier lieu dans la boulangerie et leur action anti-microbienne conduit à une inhibition des bactéries aérobies (V. Nielsen et R.Rios 2000). Cette action s’associe à celle de l’absorption de l’humidité ce qui augmente le taux d’inhibition des micro-organismes.

Plusieurs types d'emballages actifs absorbant l'oxygène ont été étudiés ces dernières années. A titre d'exemple, C. H. Lee *et al* (2004) ont développé un matériau qui est à la fois antimicrobien et antioxydant, et cela par enrobage du papier avec de la nisine et du tocophérol. C. Altieri *et al* (2004) ont proposé une alternative aux emballages habituellement utilisés pour l'élimination de l'oxygène. Cette alternative consiste à utiliser des micro-organismes, aérobies pour l'élimination de l'oxygène. Pour cela des solutions à base d'hydroxyéthylcellulose ou de polyvinylalcool ont été mélangées à un bouillon de culture de *Kocuria varians*. Ce type d'emballage a montré une grande efficacité puisque, dans les conditions de l'étude, ils ont conduit à l'élimination totale de l'oxygène au bout de 6 h pour le polyvinylalcool et de 8 h pour l'hydroxyéthylcellulose.

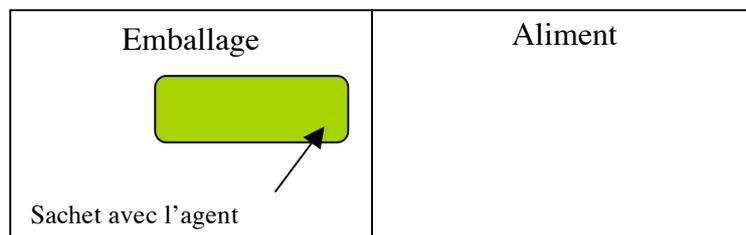


Figure 14 : Emballage anti-microbien «addition de sachet qui contient l'agent anti- microbien dans le support ».

- *Incorporation de l'agent anti-microbien directement dans l'emballage.*

L'incorporation d'un agent bioactif dans les emballages (Figure 15) est une méthode essentiellement développée dans l'industrie médicale et reste peu utilisée dans l'agroalimentaire. Cependant, au cours de ces dernières années, il y a eu plusieurs travaux de recherches sur cette thématique.

Parmi les agents anti-microbiens les plus souvent incorporés dans l'emballage, surtout, au Japon, il y a l'argent. L'argent n'est pas incorporé directement dans l'emballage, mais il est utilisé dans des zéolites (le sodium présent dans les zéolites est substitué par l'argent) et cela avec des teneurs allant de 1 % à 3 %. Les polymères utilisés pour l'incorporation de l'argent sont : le polyéthylène, le nylon et le butadiène.

Un autre exemple peut être mentionné avec l'hexaméthylène tétramine (HMT) en tant que biocide. Ce dernier est un agent anti-microbien issu de l'industrie médicale dont l'action résulte de la libération de formaldéhyde qui agit sur les enzymes et les protéines existantes dans la cellule bactérienne. L'incorporation dans le polyéthylène à faible densité LDPE

(F.Devlieghere et al 2000) à 5 % (m/m) de HMT permettrait de réduire le nombre de bactéries lactiques de 10^8 UFC/g à $10^{6,5}$ UFC/g sur du jambon.

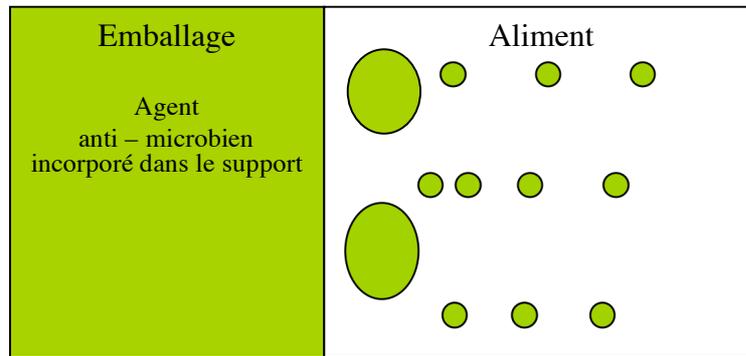


Figure 15 : Emballage anti-microbien «incorporation de l'agent anti-microbien dans le support».

Certains composés peuvent avoir à la fois un effet anti-microbien et antioxydant. C'est le cas du nitrite de sodium, qui, incorporé dans du LDPE, présente une activité anti-bactérienne contre *Bacillus subtilis* et *Aspergillus niger*. Cependant, ce type d'emballage n'a montré que de faibles propriétés mécaniques qui s'illustrent par une très faible résistance à la rupture (Jari Vartiainen 2003).

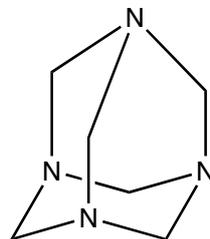


Figure 16 : Structure chimique de la HMT (F. Devlieghere *et al* 2000).

N.F.F Soares *et al* (2002) ont développé un emballage antimicrobien par incorporation de propionate de sodium dans l'acétate de cellulose. Les auteurs ont observés que ce type d'emballage pouvait permettre de réduire la croissance des moisissures sur le pain de 70 %.

D'autres auteurs ont étudiés des films composites obtenus par association du chitosane et l'HPMC, et ont montré, dans certaines conditions, une inhibition complète de la croissance de *Listeria monocytogenes* (Moller *et al* 2004)

- *Enrobage du support par un agent anti-microbien.*

L'enrobage constitue une autre méthode pour introduire un agent bioactif dans un matériau (Figure 17).

La nisine, bactériocine produite par *Lactococcus lactis*, est parmi les agents anti-microbiens les plus utilisés sous forme d'enrobage. Ce peptide a montré une grande efficacité contre les bactéries à gram positif telles que *L. monocytogenes*, mais son efficacité est moindre contre les bactéries à gram négatif telles que *E.coli*.

La nisine a été utilisée sous forme d'enrobage sur divers matériaux cellulosiques tel que le papier ou des matériaux plastiquerivés. Certains auteurs ont montré que ce type d'emballage présentait une grande efficacité pour l'inhibition de *Micrococcus flavus* (C. H. Lee *et al* 2003). L'efficacité de ce type de matériaux dépend principalement de la désorption et de la migration des biocides au sein de l'aliment. (Y. M. Kim *et al* 2002 ; Sebti *et al.*, 2004).

Il a été montré que cette migration des bactériocines dépend de la température (augmentation de la solubilité des bactériocines avec la température), de la nature de l'aliment et de la nature du polymère utilisé en tant que matrice. Ainsi le coefficient de diffusion de la nisine dans l'eau passe de $4,2 \times 10^{-12} \text{ g.m}^2.\text{s}^{-1}$ pour un polymère acrylique à $9,3 \times 10^{-12} \text{ g.m}^2.\text{s}^{-1}$ pour un copolymère éthylène-acétate de vinyle (Y. M. Kim *et al* 2002).

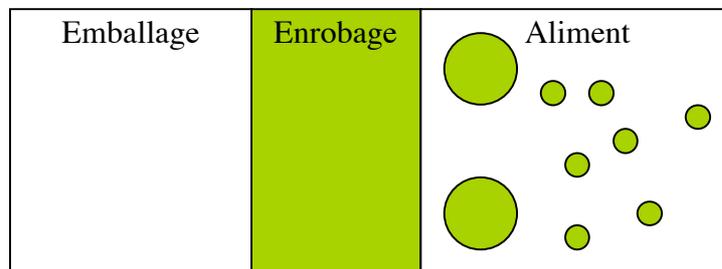


Figure 17 : Emballage anti-microbien « enrobage du support par un agent anti-microbien».

- *Immobilisation de l'agent anti-microbien dans le support.*

L'immobilisation consiste à fixer un agent anti-microbien dans un polymère par des liaisons ioniques ou covalentes (Figure 18).

Appendini and Hotchkiss (1997) ont mentionné que le lysozyme, enzyme naturellement présente dans le lait et les œufs, pourrait assurer la protection intrinsèque des aliments contre les bactéries pathogènes à Gram positif telles que *L.monocytogenes*.

La membrane externe des bactéries Gram négatif protège les bactéries contre l'action du lysozyme, une action de ces enzymes couplée à l'EDTA permettrait de déstabiliser cette

membrane externe dans un premier temps, pour laisser agir le lysozyme dans un second temps.

Ces mêmes auteurs ont également mentionné une immobilisation des enzymes sur le triacétate de cellulose ayant conduit à une élimination de 90 % des *Micrococcus lysodeiktius* après une première utilisation, et de 60 % après 20 utilisations.

La fixation de l'agent anti-microbien dans le support peut se faire directement, comme les exemples donnés pour le lysozyme, comme il peut également se faire à l'aide d'une molécule intermédiaire, comme certains exemples de fixation de peptides dans le polystyrène à l'aide de polyéthylèneglycol (P. Appendini et J.H.Hotchkiss 2001).

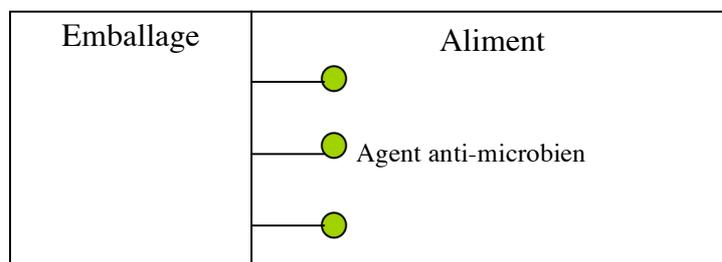


Figure 18 : Emballage anti-microbien « immobilisation de l'agent anti-microbien».

- *Utilisation de biopolymère antibactérien : chitosane.*

Ce biopolymère présente des propriétés très intéressantes. Il est non-toxique, biodégradable, renouvelable, filmogène et antimicrobien. Ces propriétés font du chitosane un des biopolymères qui suscite beaucoup d'intérêt dans la recherche sur les bioemballages.

Le chapitre suivant présente une vue d'ensemble sur les propriétés et l'utilisation de ce biopolymère.

Chapitre 4. Le chitosane : obtention, caractéristiques et activité antimicrobienne.

4.1. Voie d'obtention.

Le chitosane est un dérivé déacétylé de la chitine, qui est un constituant de la paroi des crustacés (20 à 30 %) et des insectes. Il est, après la cellulose, le polysaccharide le plus répandu dans la nature.

La chitine est un polymère composé d'unité N-acétyl-D-glucosamine et d'unité D-glucosamines, liées entre elles par des liaisons β 1-4. La Figure 19 présente cette structure.

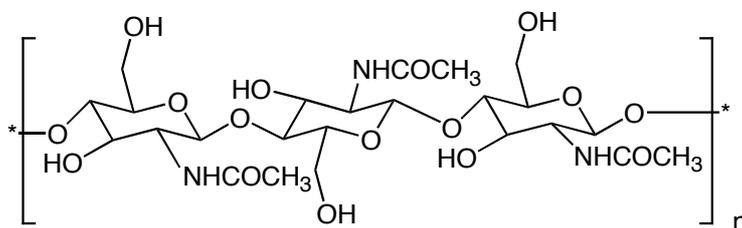


Figure 19 : Structure chimique idéale de la chitine.

L'obtention de la chitine se fait en 3 étapes (Hong Kyoon No *et al* 2003) :

- Étape 1 : La déminéralisation se fait par l'acide chlorhydrique 1N, pendant 30 min, à température ambiante et avec un rapport solide / solvant de 1/15.
- Étape 2 : La déprotéinisation est effectuée dans un autoclave avec une pression de 15 Psi, sous une température de 121°C, en présence d'une solution de soude NaOH à 3% et avec un pourcentage solide/solvant de 1/10.
- Étape 3 : Le blanchiment se fait avec une solution d'hypochlorite de sodium NaOCl à 0,32%, pendant 3 min et avec un rapport solide / solvant de 1/10.

La production de la chitine est estimée en 2000 à 10000 tonnes. La majorité de cette quantité (soit 65 %) est transformée en glucosamines, 10 % sont transformés en oligosaccharides et 25 % sont transformés en chitosane (M. Eikenes *et al* 2005). Les plus grands producteurs de chitine sont le Japon, l'Inde, la Norvège et l'Australie.

La déacétylation de la chitine permet l'obtention du chitosane qui est un polymère linéaire, composé d'unités N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine, liées entre elles par des liaisons β 1-4. On parle du chitosane à partir d'un degré de déacétylation de 60 %. La Figure 20 présente la structure chimique du chitosane.

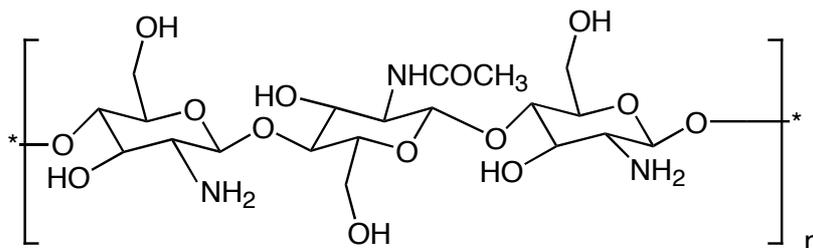


Figure 20 : Structure chimique idéale du chitosane.

Les meilleures conditions de déacétylation de la chitine (obtention d'un degré de déacétylation de 98 %) sont obtenues avec une solution de NaOH à 60 %, un chauffage de 80 °C et une durée de réaction de 120 min (P. Methacanon *et al* 2003).

Le chitosane est aussi présent dans la nature au niveau des parois cellulaires de certaines souches fongiques, surtout les zygomycètes (S. C. Tan *et al* 1996, V. Rungsardthong *et al* 2005).

L'obtention du chitosane à partir de ces souches fongiques est envisageable. D'ailleurs, cette méthode présente un certain avantage par rapport au procédé habituel utilisé pour la production du chitosane à partir de la chitine, puisque l'utilisation de ses souches fongiques permet la modulation des caractéristiques de ce dernier. Ainsi, S.Chatterjee *et al* 2005, ont pu obtenir du chitosane avec des masses moléculaires différentes à partir de la souche fongique *Mucor rouxii*, seulement en variant le milieu nutritionnel utilisé pour la culture de cette dernière.

4.2. Caractéristiques du chitosane.

Le chitosane est caractérisé par un degré de déacétylation (DD) et une masse moléculaire.

Le DD peut être déterminé par titrage potentiométrique (S. C. Tan *et al* 1998, Xuan Jiang *et al* 2003), par RMN du proton ^1H (S. C. Tan *et al* 1998, M. Lavertu *et al* 2005), par spectroscopie FTIR (M. L. Duarte *et al* 2002, Yougqin Zhang *et al* 2005) et par spectroscopie UV (S. C. Tan *et al* 1998). La détermination de la masse moléculaire peut être réalisée par mesure de la viscosité (S. Chatterjee *et al* 2005, V. Rungsardthong *et al* 2005, H. K. No *et al* 2002) ou par perméation sur gel (S. Matsuhahi et T. Kume 1997, A. Niederhofer et B. W. Muller 2004).

4.3. Propriétés antimicrobiennes.

Le chitosane présente des propriétés très intéressantes, il est non-toxique, biodégradable, renouvelable, antibactérien et antifongique.

4.3.1. Activité antibactérienne du chitosane.

Plusieurs travaux de recherches ont illustré l'activité anti-bactérienne du chitosane. Ainsi, I. M. Helander *et al* (2001) ont montré que l'utilisation du chitosane à forte concentration a un effet bactéricide sur des bactéries Gram négatif comme *l'Escherichia Coli* et *la Salmonella typhimurium*.

Blaise Ouattara *et al* (2000) ont montré que des films obtenus à partir d'une solution du chitosane présentent un effet inhibiteur sur les bactéries lactiques *Lactobacillus sakei*.

Comme on l'a déjà souligné, des films composites obtenus par combinaison dans les mêmes proportions du chitosane et de l'HPMC, inhibent complètement la croissance du *Listeria monocytogenes* (H. Moller *et al* 2004)

L'enrobage des fruits par le chitosane a également permis l'inhibition de la croissance la bactérie à Gram positif *Candida lambica* (F. Devlieghere *et al* 2004).

Le chitosane agit sur les bactéries à Gram positif et sur les bactéries à Gram négatif, cependant, son action sur ces dernières est moins importante que celle qui est sur les bactéries à Gram positif (H. K. No *et al* 2002 et Coma *et al* 2003).

Le Tableau 7 présente les concentrations minimales d'inhibition de quelques bactéries.

Tableau 7 : Les concentrations minimales d'inhibition de quelques bactéries par le Chitosane (X. F. Liu *et al* 2001).

Bactéries	CMI (ppm)
<i>Bacillus cereus</i>	1000
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	100
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	500
<i>Escherchia coli</i>	20
<i>Micrococcus luteus</i>	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	20

4.3.2. Activité antifongique du chitosane.

P. Laflamme *et al* (1999) ont montré que l'utilisation du chitosane à partir d'une concentration de 1 g/l réduit considérablement la croissance des souches fongiques suivante : *Cylindrocladium floridanum*, *Cylindrocarpon destructans* et *Fusarium oxysporum*. Les résultats obtenus dans cette étude sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Taux d'inhibition de quelques souches fongiques en fonction de la concentration du chitosane (Laflamme *et al* 1999).

Souches fongiques	Inhibition (%) avec du chitosane à 0,5 g/l	Inhibition (%) avec du chitosane à 1 g/l	Inhibition (%) avec du chitosane à 2 g/l
<i>Cylindrocladium floridanum</i>	20	41	56
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	23	43	71
<i>Fusarium oxysporum</i>	25	53	55

K. M. Torr *et al* (2005) ont montré que le chitosane a un effet antifongique contre *Leptographium procerum* et *Sphaeropsis sapinea* à partir d'une concentration de 0,3 % (m/V).

S. Roller et N. Covill (1999) ont étudié l'action du glutamate du chitosane sur la croissance d'*Aspergillus flavus*, de *Cladosporium cladosporioides*, de *Mucor racemosus*, de *Penicillium aurantiogriseum* et de *Saccharomyces cerevisiae*, dans le jus de pomme. L'obtention d'une action inhibitrice contre toutes ces souches a nécessité une concentration de chitosane de 5 g/l. Le Tableau 9 présente les concentrations minimales d'inhibition de quelques souches fongiques par le chitosane.

Tableau 9 : Les concentrations minimales d'inhibition de quelques moisissures par le Chitosane (X. F. Liu *et al* 2001).

Moisissures	CMI (ppm)
<i>Botrytis cinerea</i>	10
<i>Fusarium oxysporum</i>	100
<i>Piricularia oryzae</i>	5000
<i>Tichophyton equinum</i>	2500

4.4. Mode d'action du chitosane.

Le mécanisme d'action du chitosane contre les bactéries et les souches fongiques est jusqu'à aujourd'hui mal connu. Cependant, il existe plusieurs éléments qui peuvent expliquer cette action:

- La formation de liaisons électrostatiques entre les charges positives du chitosane (transformation des motifs NH_2 du chitosane en motifs $^+\text{NH}_3$ en milieu acide) et les phospholipides de la membrane cellulaire qui ont une charge négative, perturbant ainsi les échanges entre la cellule microbienne et le milieu extérieur (A. Bégin et M. R. V. Calsteren 1999, X. F. Liu *et al* 2001, F. Devlieghere *et al* 2004, Caiqun Qin *et al* 2005, Y. Peng *et al* 2005, T. S. Yang *et al* 2005).
- La présence du chitosane peut aussi entraîner des déformations morphologiques au niveau de la membrane cellulaire (Laflamme *et al* 1999, Roller et Covill 1999, I. M. Helander *et al* 2001, B. K. Choi *et al* 2001).
- L'inhibition peut aussi être due à l'enrobage des cellules microbiennes par le chitosane, éliminant ainsi toute échange avec le milieu extérieur (R. Muzzarelli *et al* 2001).
- L'action du chitosane peut aussi se faire par formation de liaison avec les protéines et les électrolytes présents dans le cytoplasme (Laflamme *et al* 1999, Bong kiu choi *et al* 2001).
- Formation des liaisons entre le chitosane et l'ADN des bactéries et l'inhibition de la synthèse du mRNA (F. Devlieghere *et al* 2004, X. F. Liu *et al* 2001).
- Le chitosane peut aussi agir de façon indirecte sur les bactéries et les moisissures, et cela par complexation des métaux nécessaires pour leur croissance (Roller et Covill 1999).

4.5. Activité du chitosane en fonction des paramètres abiotiques.

Comme cela a été souligné précédemment, les deux paramètres qui caractérisent le chitosane sont le degré de déacétylation et la masse moléculaire, d'ailleurs son activité antimicrobienne en dépend beaucoup. Cependant il existe d'autres éléments qui influencent l'activité du chitosane. Ainsi :

- L'action du chitosane est, à son maximum, à des pH faibles entre 6 et 6,5, puisque c'est dans cette zone où les groupements NH_2 sont protonés (le chitosane n'est soluble

que dans des acides dilués). Cependant, à des pH plus faibles (entre 1 et 4) l'activité du chitosane diminue. Ceci est dû à la compétition entre les protons et les groupes ammonium (Y.C. Chung *et al* 2003) vis-à-vis des cellules microbiennes.

- Il a été montré que la masse moléculaire a également une influence sur l'activité anti-microbienne du chitosane. Cependant, une règle générale définissant cette influence ne peut être établie, car elle varie différemment d'un organisme à un autre. Ainsi, un chitosane avec une masse moléculaire élevée semble plus efficace contre les bactéries Gram négatif, qu'avec les bactéries Gram positif (H. K. Na *et al* 2002). De plus, au sein du même type de bactérie, cette influence peut varier. Par exemple, avec *Escherichia coli*, bactérie Gram négatif, l'activité augmente avec la masse moléculaire jusqu'à un certain niveau ($9,16 \cdot 10^4$ g/mol) puis elle diminue car avec l'augmentation de la masse moléculaire, il y a plus d'interaction intramoléculaire entre les groupes ammonium et les groupes hydroxyle du chitosane ce qui les rendent indisponibles. (X. F. Liu 2001, W. Xie *et al* 2002)

L'action du chitosane sur les bactéries Gram négatif est limitée par la présence de cette membrane externe, mais son association à l'EDTA augmente son efficacité, car l'EDTA s'adsorbe (complexation des Mg^{2+} et Cu^{2+}) à cette membrane externe augmentant ainsi sa perméabilité (Y. C. Chung *et al* 2003).

- La présence des métaux comme Zn^{2+} , Ca^{2+} et Mg^{2+} diminue l'activité anti-microbienne du chitosane, car ce dernier complexe ces métaux (Y. C. Chung 2003 *et al*). C'est d'ailleurs, ce caractère qui est mis à profit dans le traitement des eaux usées.

4.6. Quelques modifications chimiques du Chitosane, utilisées pour augmenter sa solubilité et son activité anti-microbienne.

Le chitosane n'est soluble qu'à pH acide. Cette insolubilité dans l'eau constitue un grand inconvénient. Plusieurs dérivés du chitosane (Tableau 10) ont été étudiés dans l'objectif d'améliorer sa solubilité et son activité anti-microbienne.

B. K. Choi *et al* 2001 ont préparé des chitoooligosaccharides par dépolymérisation du chitosane avec la chitinase à 50 °C et pendant 14 h. Ces derniers de poids moléculaire plus faible ont présenté une bonne activité anti-bactérienne contre *Streptococcus mutans* à 0,1 % (m/m).

T. S. Yang *et al* 2005, ont augmenté la solubilité du chitosane par substitution d'un proton du groupement NH_2 par le cellobiose. Le dérivé obtenu a présenté aussi une bonne activité

inhibitrice vis-à-vis de *E.coli*. W. Xie *et al* 2002, ont synthétisé un copolymère à partir de l'acide maléique et de l'hydroxypropylchitosane qui est obtenu par réaction entre le chitosane et l'époxypropane en milieu basique. Ce copolymère a présenté un effet bactéricide sur *Staphylococcus aureus* et *E. coli*. L'action bactéricide dans ce cas n'est pas attribuée à la formation des liaisons électrostatiques avec les sites négatifs de la membrane cellulaire, car à pH neutre ce copolymère est chargé négativement, mais elle est basée sur l'affinité qui existe entre la partie hydrophobe du copolymère et les lipides de la membrane et entre la zone hydrophile du polymère et celle de la membrane. R. Muzzarelli *et al* 2001 ont étudié l'activité antifongique du N-carboxyméthylchitosane (NCM), du N,N-dicarboxyméthylchitosane (DCM) et du N-phosphonométhylchitosane (NPHM). Cette étude a montré que les composés NCM et NPHM présentaient une bonne activité anti-fongique, alors que le DCM a favorisé la croissance de certaines moisissures. S. H. Lin et S. M. Hudson 2004, ont synthétisé l'o-acrylamide méthyl-N[(2-hydroxy-3-triméthylammonium)propyl]-chitosane (NMA-HTCC). L'introduction du groupement ammonium a permis la solubilisation du chitosane, quel que soit le pH de la solution et l'augmentation de son activité anti-bactérienne (Figure 21).

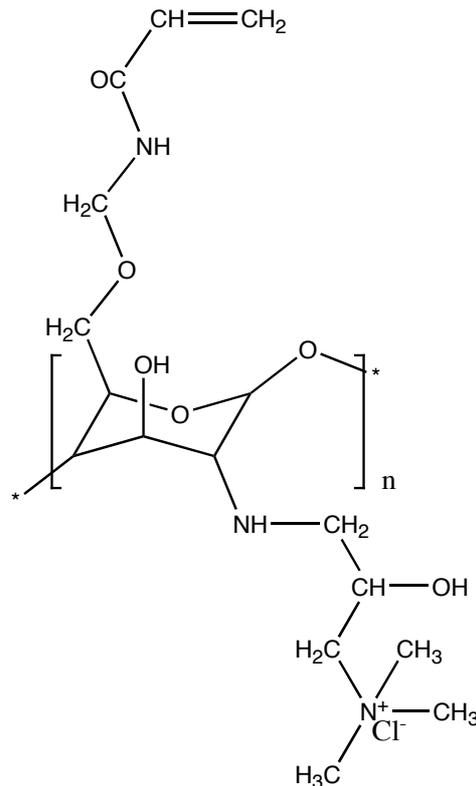


Figure 21 : Structure chimique du NMA-HTCC.

Le caractère complexant du chitosane a été aussi mis à profit pour améliorer son activité antimicrobienne. Un complexe Chitosane-Zn²⁺ (X. Wang *et al* 2004) a présenté une efficacité supérieure à celle du chitosane sur *E. coli*.

Z. Jia *et al* 2001 rapportent que la quaternisation du chitosane améliore son activité antibactérienne. Cependant, les résultats de cette étude restent sujet à discussion car les auteurs ont travaillé avec des concentrations massiques en chitosane et en N,N,N-triméthylchitosane, ce qui conduit à comparer ce qui est incomparable, puisqu' une même masse de chitosane et de N,N,N-triméthylchitosane ne correspondent pas aux même nombre de motifs actifs, or, ce sont ces motifs actifs qui sont responsables en grande partie de l'activité antibactérienne de ces deux composés.

Ainsi, par exemple, 1 g de chitosane correspond à $6 \cdot 10^{-3}$ mol de motifs amine, par contre, 1 g du N,N,N-triméthylchitosane avec un degré de quaternisation de 100 % correspond à $2,9 \cdot 10^{-3}$ mol de motifs quaternaires.

Tableau 10 : Quelques modifications chimiques du chitosane.

Dérivés du Chitosane	Micro-organisme cible	Références
Chitoooligosaccharide	<i>Streptococcus mutans</i>	B. K. Choi <i>et al</i> 2001
N-alkylcellobiose chitosane	<i>E. coli</i>	T. S. yang <i>et al</i> 2005
N-carboxyméthylchitosane	<i>Saprolegnia parasitica</i>	Muzzarelli <i>et al</i> 2001
O-acrylamide méthyl N-[(2-hydroxy-3-triméthyl ammonium)propyl] chitosane	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>E. coli</i>	S. H. Lin <i>et al</i> 2004
Complexe chitosane-Zn ²⁺	<i>E. coli</i>	X. Wang <i>et al</i> 2004
Ammoniums quaternaires du chitosane	<i>E. coli</i>	Z. Jia <i>et al</i> 2001
Hydroxypropylchitosane	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>E. coli</i>	W. Xie <i>et al</i> 2002

4.7. Exemples d'utilisation du chitosane.

L'aspect biocompatible et non-toxique du chitosane a permis son utilisation dans la fabrication de peau artificielle (A. D. Martino *et al* 2005) et dans la médecine vétérinaire (S. Senel et S. M. Clure 2004).

Le chitosane a été aussi utilisé pour stimuler les défenses naturelles des plantes. Ainsi la pulvérisation des vignes par le chitosane augmente la production des chitinases, des β -1,3-

glucanase (qui dégradent la paroi des moisissures) et de la biosynthèse de composés phénoliques qui agissent comme anti-microbiens (E. Amborabe *et al* 2004).

Il a aussi été utilisé pour la fabrication de textiles ayant des propriétés antimicrobiennes (Y. Shin *et al* 2001, W. Ye *et al* 2005, K. F. El-tahlawy *et al* 2005).

La similitude qui existe entre le chitosane et la cellulose au niveau structural a permis son utilisation comme agent de couplage dans les composites bois-plastiques (B. L. Shah *et al* 2005).

M. Eikenes *et al* (2005) ont montré que le chitosane peut être utilisé comme produit de préservation du bois contre *Poria placenta* et *Coniophora puteana* qui sont des pourritures cubiques.

Un autre aspect de l'utilisation du chitosane, consiste en l'enrobage des fruits tel le litchi pour leur permettre de garder coloration et saveur (Y. Jiang *et al* 2005).

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 5. Synthèse du N,N,N-triméthylchitosane.

5.1. Alkylation du chitosane.

L'activité antimicrobienne ainsi que la solubilité du chitosane sont obtenue en milieu acide suite à la protonation des groupements amines. Cette insolubilité dans l'eau à pH neutre constitue un inconvénient et représente un obstacle à son utilisation comme agent antimicrobien.

Afin de le rendre soluble dans l'eau, tout en augmentant son activité antimicrobienne, la modification chimique du chitosane par quaternisation a été entreprise

Cette quaternisation du chitosane s'est effectuée en deux étapes :

- La monoalkylation du groupement amine.
- La quaternisation de l'alkyl chitosane.

La Figure 22 présente une schématisation de cette quaternisation.

En présence d'amine, les aldéhydes et les cétones forment des hémiaminals analogues azotés des hémiacétals. Les hémiaminals provenant des amines primaires, comme c'est le cas pour le chitosane, perdent facilement de l'eau, ce qui engendre une double liaison carbone-azote. La réduction de la double liaison par le borohydrure de sodium permet d'obtenir un N-alkylchitosane. Les aldéhydes utilisés pour l'alkylation du chitosane sont le formaldéhyde, l'acétaldéhyde et l'heptaldéhyde. La caractérisation des N-alkylchitosanes s'est faite par FTIR (Figure 23).

La quaternisation des N-alkylchitosanes obtenus se fait par l'iodométhane en présence de l'hydroxyde du sodium, à une température de 60°C, pendant 6 h et sous une forte agitation.

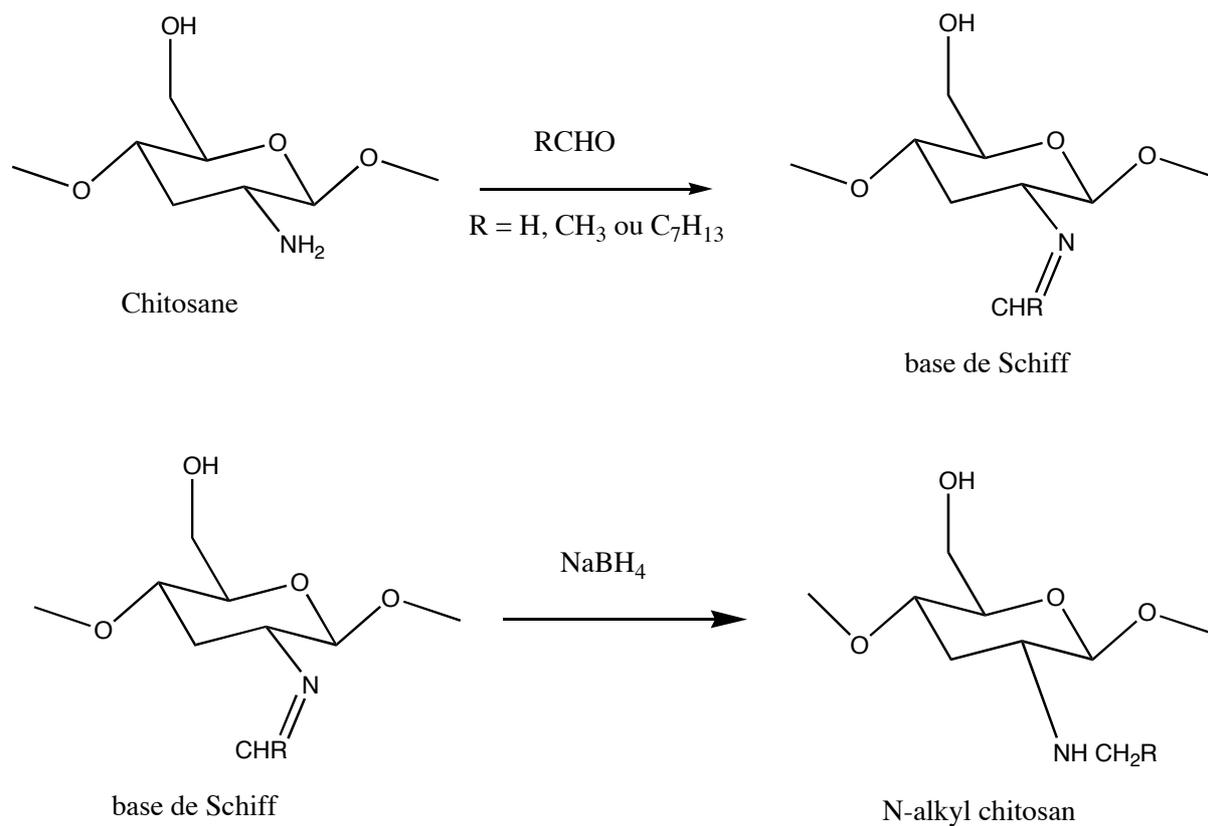
La présence de l'hydroxyde du sodium permet la fixation de l'acide iodohydrique libéré après la substitution d'un proton hydrogène par un méthyle, permettant ainsi l'augmentation du degré de quaternisation (Z. Jia *et al* 2001).

Seule la réaction avec le formaldéhyde a conduit au produit désiré avec un taux d'alkylation élevé. L'acétaldéhyde et l'heptaldéhyde conduisent à un taux d'alkylation inférieure à 10% quelles que soient les conditions expérimentales. Cette réactivité nettement plus faible peut être due à une approche plus difficile du site réactionnel.

L'étude de l'activité antifongique et antimicrobienne a par conséquent était réalisée avec le triméthylchitosane.

La caractérisation du N,N,N-triméthylchitosane est faite par RMN du proton (Figure 24).

Étape 1 : monoalkylation du groupement amine



Étape 2 : quaternisation de l'alkyl chitosane

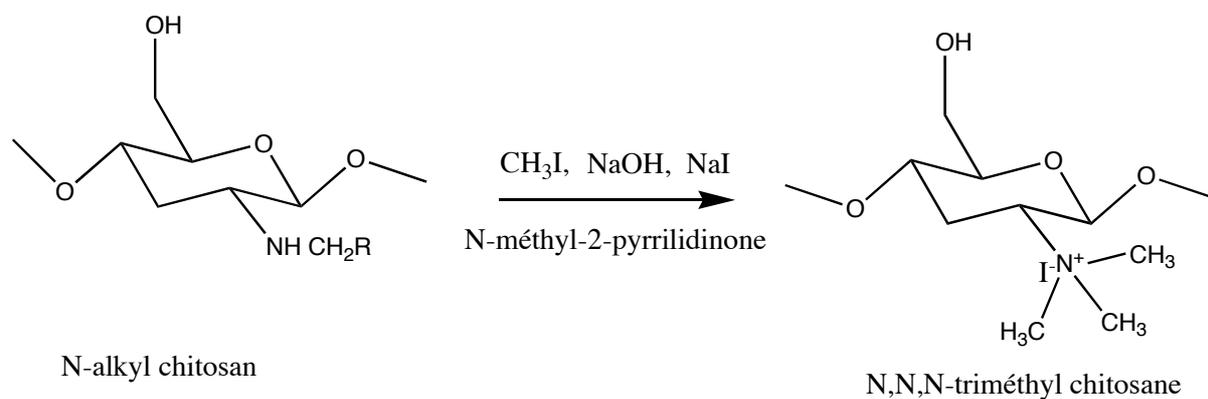


Figure 22 : Quaternisation du chitosane

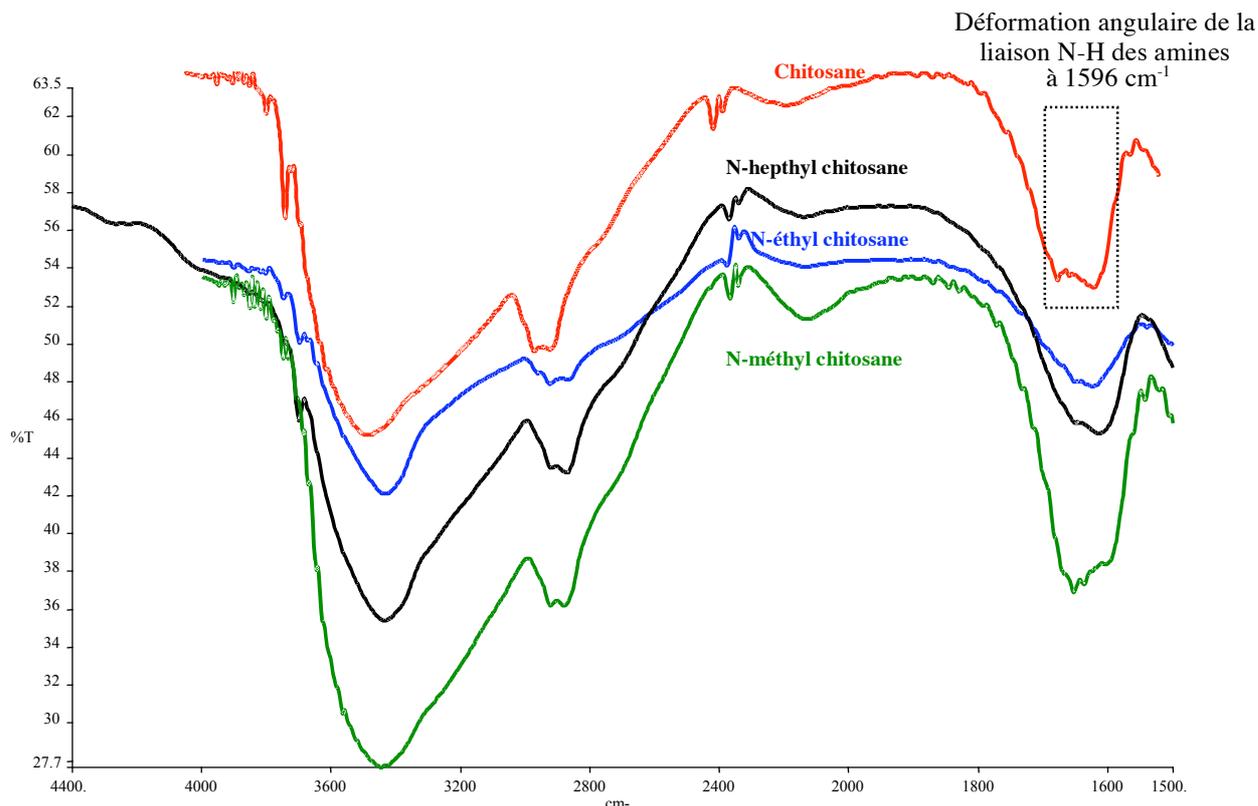


Figure 23 : Spectres Infra-Rouge du chitosane, N-méthylchitosane, N-éthylchitosane et N-heptylchitosane

Tableau 11 : Absorptions des groupements chimiques présents dans le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane (M. J. Charrier *et al* 1995, L. Chen *et al* 2003, K. V. de Velde et P. Kiekens 2004, X. Peng et L. Zhang 2005).

Type de déformation	Absorption (cm ⁻¹)
Élongation des liaisons O-H (pont hydrogène)	3440
Élongation asymétrique de la liaison C-H des méthylènes.	2920
Élongation symétrique de la liaison C-H des méthyles.	2874
Élongation de la double liaison C=O des amides	1650
Déformation angulaire de la liaison N-H des amides.	1630
Déformation angulaire (cisaillement) de la liaison N-H des amines.	1590-1600

L'alkylation du chitosane est caractérisée essentiellement par la disparition des groupements amines primaires (Figure 23), puisque le pic caractéristique de la déformation angulaire

(cisaillement) de la liaison N-H des amines primaires qui apparaît à 1600 cm^{-1} , disparaît après cette réaction.

Les autres groupements du chitosane ne subissent aucune modification après l'alkylation. Le Tableau 11, regroupe les attributions de ces groupements chimiques.

5.2. Quaternisation du chitosane.

Après addition de l'iodométhane sur le N-méthylchitosane (Figure 24) on a obtenu le N,N,N-triméthylchitosane.

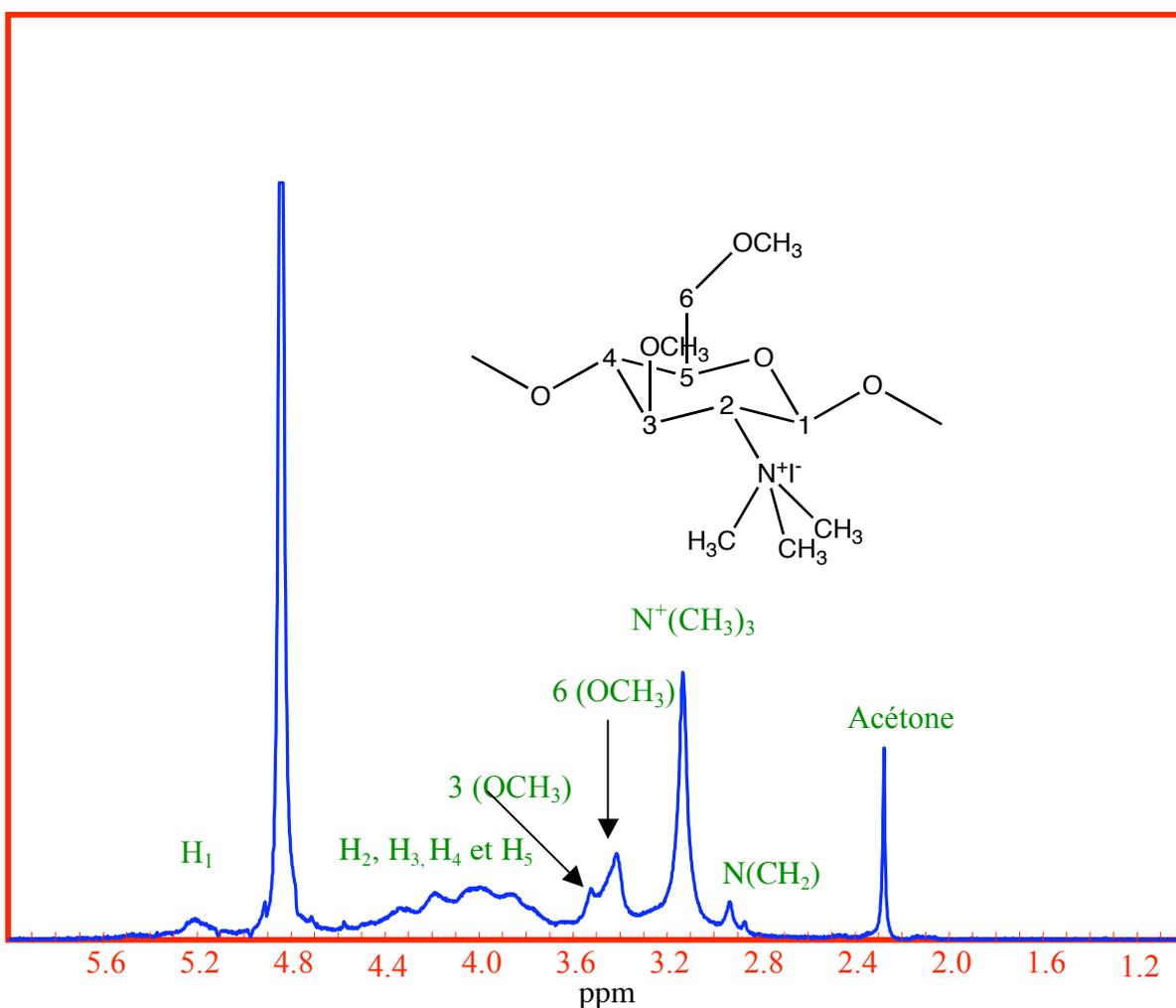


Figure 24 : Spectre RMN ^1H du N,N,N-triméthylchitosane.

Le N,N,N-triméthylchitosane est caractérisé par la présence du groupement $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ qui apparaît à un déplacement chimique de 3,13 ppm. Le même déplacement chimique a été

obtenu dans plusieurs travaux sur le N,N,N-triméthylchitosane (D.Snyman et al 2002, A.Polnok et al 2004).

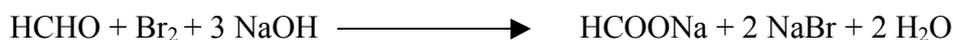
Le N,N,N-triméthylchitosane obtenu présente un degré de quaternisation très élevé (95±4 %) et une solubilité totale dans l'eau (une masse de 4 g du N,N,N-triméthylchitosane est totalement soluble dans 100 ml d'eau au bout de quelques minutes).

La détermination du degré de quaternisation du N,N,N-triméthylchitosane est effectuée par dosage des ions iodures.

En premier lieu, les ions iodures sont oxydés par de l'eau de brome. Il y a alors formation de l'iodate selon la réaction suivante :



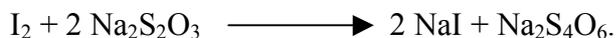
Cette réaction est quantitative en présence d'un excès de brome, qui est éliminé par addition de formaldéhyde et de NaOH.



Les ions iodates présents dans la solution sont ensuite oxydés en iode par de l'iodure de potassium.



L'iode ainsi libéré est dosé par une solution de bisulfite de sodium.



Cette forte quaternisation des amines du chitosane s'est accompagnée par une méthylation des groupements OH des carbones 3 et 6 (A.Polnok 2004), caractérisée par les déplacements chimiques suivants :

- -O-CH₃ du carbone 3 apparaît à un déplacement chimique de 3,51 ppm.
- -O-CH₃ du carbone 6 apparaît à un déplacement chimique de 3,41 ppm.

Le taux de méthylation des carbones 3 et 6 peut atteindre respectivement 82 % et 98 % (A.Polnok *et al* 2004).

Le degré de quaternisation du chitosane dépend essentiellement de la quantité d'iodométhane (D.Snyman *et al* en 2002 et T. Kean *et al* en 2005).

5.3. Conclusion.

Au cours de cette première partie de notre travail, on a pu atteindre notre premier objectif, qui était la synthèse d'un dérivé du chitosane (N,N,N-triméthylchitosane) totalement soluble dans l'eau.

La suite de notre étude sera composée de deux parties :

- L'utilisation du N,N,N-triméthylchitosane comme agent de préservation du bois contre les attaques fongiques.
- Utilisation du N,N,N-triméthylchitosane dans la formulation et l'étude des biomatériaux à base d'hydroxypropylcellulose (HPC).

Ainsi, la partie II présentera les résultats et discussion concernant la préservation du bois par le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane, et la partie III présentera les résultats et discussion concernant la préservation des aliments par des emballages à base d'HPC et du chitosane ou bien à base d'HPC et du N,N,N-triméthylchitosane

Chapitre 6. Préservation du bois.

Le bois est un matériau vulnérable face aux attaques des souches fongiques, insectes xylophages, termites et térébrants marins.

Les souches fongiques sont les principaux responsables de la dégradation du bois. Ces organismes assurent leur nutrition par digestion des constituants du bois (lignine, cellulose et hémicellulose), leur action destructive aboutit à une diminution des propriétés mécaniques du bois, voir leur annulation, la phase ultime de destruction étant la pourriture du matériau.

Le caractère vulnérable du bois face à ces agents destructeurs nécessite l'utilisation d'un produit de préservation pour que le matériau-bois puisse assurer toutes ces fonctions.

Le but de notre travail de recherche est la synthèse de produits de préservation du bois répondant à deux exigences principales du consommateur qui sont : *respect de l'environnement et efficacité*.

Le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane, répondent à la première exigence, puisqu'ils sont des composés non-toxiques et biodégradables. En ce qui concerne leur efficacité, ce chapitre rassemble les résultats et les discussions concernant son évaluation.

6.1. Traitement du bois par le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane.

Le traitement des éprouvettes de bois par le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane se fait par imprégnation selon un procédé vide/pression.

Les blocs de bois sont placés dans un récipient qu'on introduit à l'intérieur d'un dessiccateur équipé d'un robinet à deux voies puis soumis à un vide de 7 mbar pendant 15 min de façon à chasser l'air contenu dans le bois. La solution de traitement est alors introduite par aspiration jusqu'à ce que les éprouvettes soient totalement recouvertes, puis la pression atmosphérique est rétablie.

Ce procédé d'imprégnation a pour avantage l'utilisation seulement de la pression atmosphérique pour l'imprégnation.

- Solution de Chitosane à 2 % (m/m), soit une concentration de 0,1 mol/L en motif amine dans l'acide acétique à 2.5 % (m/m).

- Solution de N,N,N-triméthylchitosane à 4 % (m/m) soit 0,1 mol/L en motifs quaternaires, dans l'eau distillée.

La masse m_t est la somme de la masse du bois et la masse du produit de traitement, on peut alors calculer le pourcentage de produit retenu dans le bois ou gain de masse.

Taux de traitement (kg/m^3) = $m_1 - m_0 / V_{\text{éproutette}}$. Le Tableau 12, représente les taux du traitement du bois obtenus.

Tableau 12 :Taux du traitement des éprouvettes du bois par le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane.

Produit de traitement	Taux de traitement (Kg/m^3)
Chitosane	7 ± 2
N,N,N-triméthylchitosane	21 ± 2

Le faible taux de traitement obtenu avec le chitosane est vraisemblablement dû à sa viscosité qui est liée à sa masse moléculaire (M_w chitosane = 4.10^5 g/mol), car le chitosane, avec un poids moléculaire élevé, ne peut pas franchir les ponctuations des cellules du bois (E. Larnoy *et al* 2005). Cependant, l'utilisation d'un autoclave à la place d'un simple dessiccateur pour l'application du couple vide/pression pourra améliorer le taux de traitement.

6.2. Test du lessivage.

Le test du lessivage a été réalisé selon la norme française NF X41-565. Dans cette étude, chaque éprouvette est placée dans un récipient contenant cinq fois son volume d'eau distillée et soumise à une faible agitation. Une première phase de macération est alors effectuée en réalisant trois cycles de lessivage (1, 2 et 4 heures) avec changement d'eau entre chaque cycle. Après cette première phase, les éprouvettes sont séchées à l'air libre pendant 16 h. Elles sont ensuite soumises à une deuxième phase de macération (trois cycles de lessivage pendant 8, 16 et 48 heures) avec changement d'eau entre chaque cycle.

Enfin, les éprouvettes sont séchées pendant 3 jours dans une étuve à 80°C , puis pesées.

La détermination du taux du lessivage du chitosane est réalisée par dosage de l'azote dans les eaux de macération par la méthode Kjeldhal.

Pour le N,N,N-triméthylchitosane, le taux du lessivage est déterminé par dosage des ions iodures dans les eaux de macération. Le Tableau 13, représente les taux du lessivage obtenus après 79 heures de lessivage.

Tableau 13 : Taux du lessivage du Chitosane et du N,N,N-triméthylchitosane.

Produit de traitement	Taux du lessivage (%)
Chitosane	29 ± 1
N,N,N-triméthylchitosane	51 ± 2

Avec un taux de lessivage de 29 %, le chitosane présente une bonne résistance au lessivage. Le N,N,N-triméthylchitosane présente aussi une assez bonne résistance au lessivage et cela malgré sa grande solubilité dans l'eau.

Cette résistance au lessivage du chitosane et du N,N,N-triméthylchitosane, est due en grande partie aux interactions électrostatiques entre les charges positives qu'ils portent et les charges négatives présentes sur les constituants du bois (cellulose, hémicelluloses et lignine) (M. Eikenes *et al* 2005). L'aspect macromoléculaire du chitosane et du N,N,N-triméthylchitosane constitue aussi un obstacle au lessivage (E. Larnoy *et al* 2005).

Pour plus de compréhension du phénomène du lessivage du chitosane et du N,N,N-triméthylchitosane, une cinétique du lessivage a été réalisée.

Cette cinétique a été établie par dosage des ions iodures dans les eaux de macération et cela après chaque cycle de lessivage.

La Figure 25 représente cette cinétique. Chaque point présent sur le graphe correspond à un cycle de lessivage.

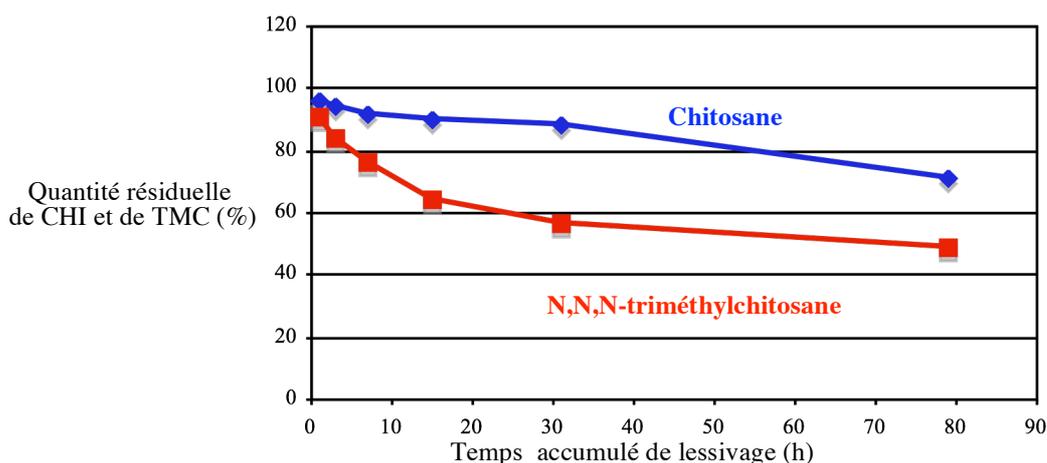


Figure 25 : Cinétique du lessivage du chitosane (CHI) et du N,N,N-triméthylchitosane (TMC).

Le suivi de la cinétique du lessivage a montré que pour le N,N,N-triméthylchitosane, le taux du lessivage est pratiquement indépendant du temps de macération, ainsi par exemple, le taux

du lessivage de 7% obtenu après un cycle de macération d'une heure est de même ordre que les 9 % obtenus après un cycle de 48 h.

Pour le chitosane, les taux de lessivage obtenus pendant les cinq premiers cycles sont très faibles et pratiquement identiques (de 2 à 3%). Après un cycle de lessivage de 48 h, le taux de lessivage obtenu (18%) est 9 fois supérieur aux taux obtenus dans les cycles précédents, et 2 fois supérieur à celui obtenu pour le N,N,N-triméthylchitosane après une même durée de lessivage.

Le lessivage pendant une longue durée (48 h) permet à l'eau d'atteindre les lumens des cellules, lieu de précipitation du chitosane après le séchage (M. Eikenes *et al* 2005), ce qui augmente le taux de lessivage de ce dernier (18%).

6.3. Traitement du bois par le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane : évaluation de l'efficacité anti-fongique.

Des éprouvettes préalablement traitées avec le chitosane à 2% (m/m) dans l'acide acétique à 2,5% (m/m) ou le N,N,N-triméthylchitosane à 4 % (m/m), sont pesées et soumises aux UV pendant 30 min, afin de diminuer toute contamination initiale du bois, et sont ensuite introduites aseptiquement dans des boîtes de Pétri contenant les souches fongiques suivantes :

- *Coriolus versicolor*, référence 1000/2, CIRAD.
- *Poria placenta*, référence 1000/2, CIRAD.
- *Picnoporus sanguineus*, référence 1969/1, CIRAD.
- *Antrodia*, 2304/1, CIRAD.

La répartition des éprouvettes est établie comme suit :

- Quatre éprouvettes traitées et non-lessivées, deux éprouvettes non-traitées et non-lessivées par boîte de Pétri et par champignon, pour évaluer la protection conférée aux éprouvettes.
- Quatre éprouvettes traitées et lessivées, deux éprouvettes non-traitées mais lessivées, par champignon, et cela pour évaluer la résistance de notre composé au lessivage.
- Quatre éprouvettes traitées, sur milieu gélosé non-inoculé avec une souche fongique pour évaluer les pertes de masse dues à la diffusion. Ces pertes de masse correspondent au coefficient de correction.

L'incubation des éprouvettes est réalisée à 25 °C et 75 % d'humidité relative, pendant 60 jours.

Une fois l'incubation finie, les éprouvettes sont alors retirées des boîtes de Pétri. Celles placées dans des cultures fongiques sont débarrassées du mycélium adhérent, séchées pendant 3 jours à 80°C et pesées. L'efficacité du traitement est estimée par la perte de masse des éprouvettes déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Perte de masse (\%)} = \left(\frac{m_0 - m_2}{m_2} \times 100 \right) - C$$

Où m_0 est la masse initiale sèche des éprouvettes, m_2 la masse sèche des éprouvettes traitées, ou non après 8 semaines d'incubation.

C est le coefficient de correction qui correspond à la moyenne des pertes de masse dues à la diffusion.

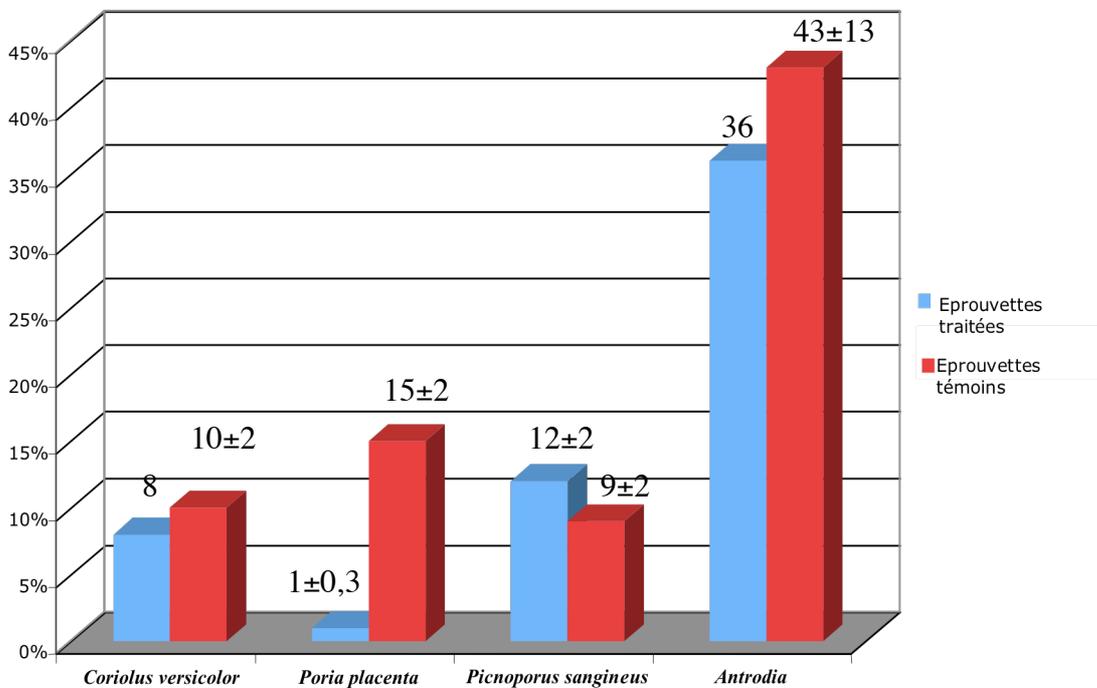


Figure 26: Perte de masse des éprouvettes traitées avec le chitosane et non-lessivées.

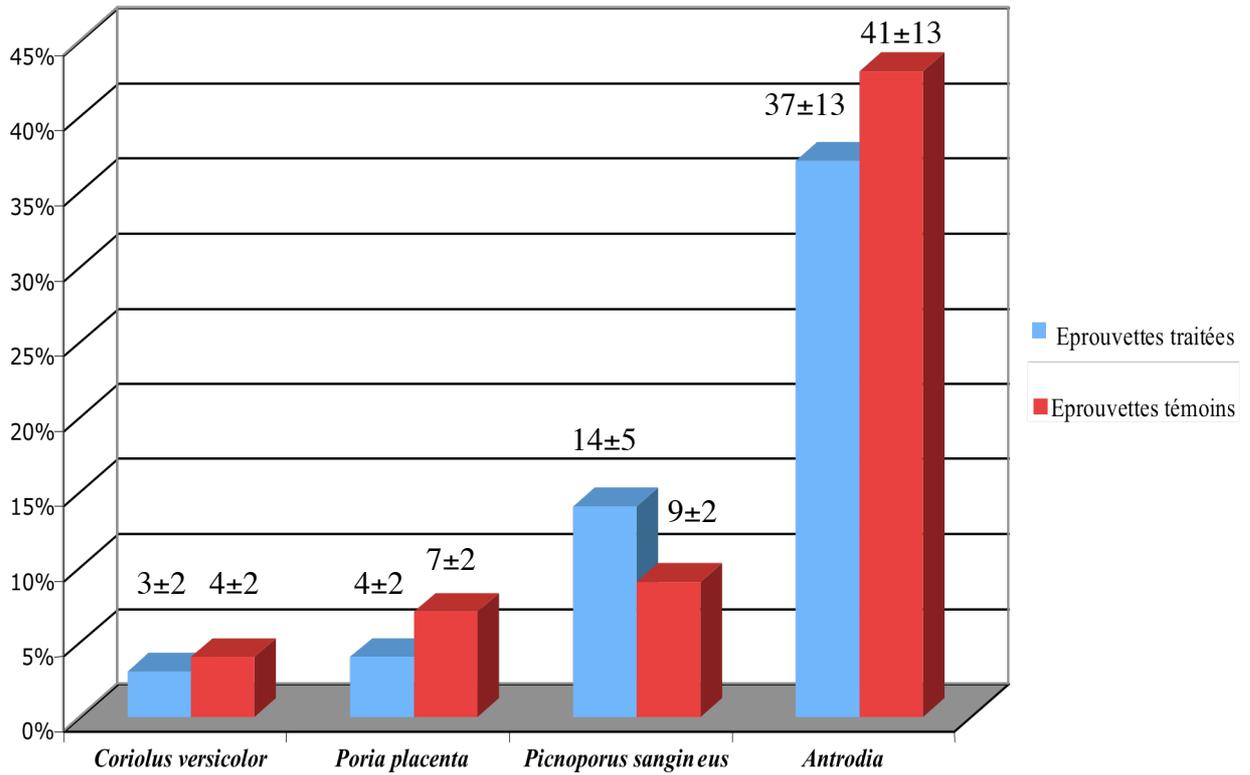


Figure 27: Perte de masse des éprouvettes traitées avec le chitosane et lessivées.

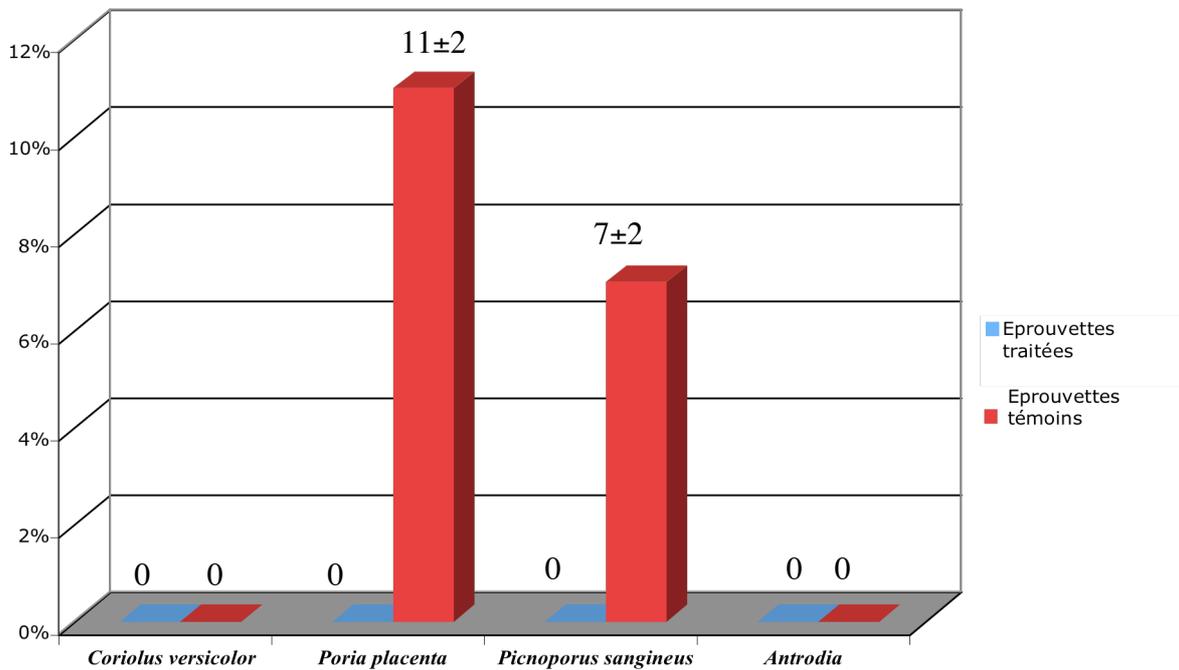


Figure 28: Perte de masse des éprouvettes traitées avec N,N,N-triméthylchitosane et non-lessivées.

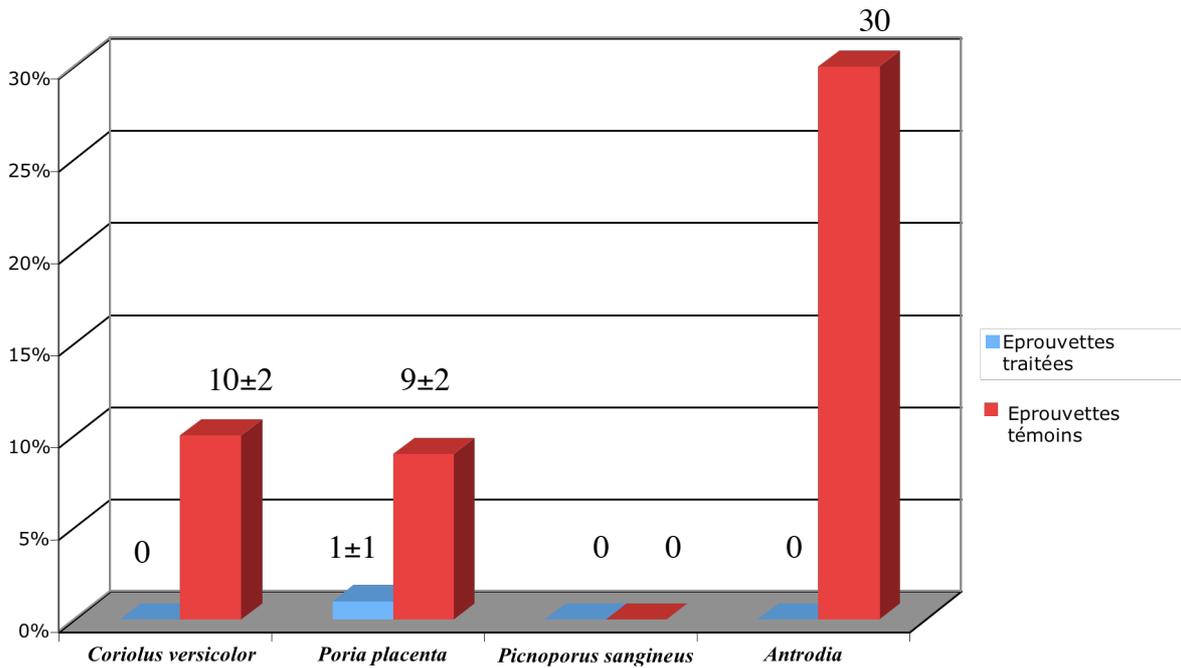


Figure 29: Perte de masse des éprouvettes traitées avec N,N,N-triméthylchitosane et lessivées.

Ces résultats montrent que le chitosane utilisé avec une concentration de 2% (m/m) dans l'acide acétique à 2,5 % (m/v) ne confère aucune protection aux éprouvettes du bois contre les souches fongiques suivantes : *Coriolus versicolor*, *Picnoporus sanguineus* et *Antrodia*, et ce, avant ou après le lessivage (Figure 26 et Figure 27).

Avec la souche fongique *Poria placenta*, les éprouvettes traitées avec le chitosane (Figure 26) et qui n'ont pas subi de lessivage présentent une perte de masse très faible (1 %) comparée à celle obtenue avec des éprouvettes témoins (15 %). Cependant, cette protection conférée par le chitosane contre cette souche fongique diminue fortement après le lessivage, puisque la perte de masse obtenue avec les éprouvettes traitées (4 %) est du même ordre que celle obtenue avec les éprouvettes témoins (7 %).

De manière générale, le chitosane à 2 % en masse, dans une solution d'acide acétique à 2,5 %, ne peut être utilisé comme produit de préservation du bois, puisque, aux problèmes liés au traitement (grande viscosité), vient s'ajouter une très faible efficacité contre les souches fongiques.

K. T. Furukawa *et al* (1995) ont montré pour leur part, que l'utilisation du chitosane avec une concentration de 2 % (m/v) ne confère au bois aucune protection contre la pourriture brune *Tyromyces palustris*.

Récemment, M. Eikenes *et al* (2005) ont montré que la concentration optimale pour la préservation du bois par le chitosane contre *Poria placenta* et *Coniophora puteana* est de 4,8% (m/v).

Les résultats obtenus dans notre étude, ainsi que ceux de la littérature montrent bien que la préservation du bois par le chitosane nécessite des concentrations élevées (supérieur à 4,8% m/v).

La nécessité d'utiliser des fortes concentrations en chitosane pour la préservation du bois est due en grande partie à la perte du chitosane de ses charges positives au cours du séchage, ce qui diminue son activité antifongique, puisque cette activité est due essentiellement aux interactions électrostatiques entre ces charges et les charges négatives présentes au niveau des membranes des cellules fongiques.

Le N,N,N-triméthylchitosane à 4% (m/m) dans l'eau distillée, a conféré aux éprouvettes du bois une protection totale contre toutes les souches fongiques, et ce, avant ou après le lessivage (Figure 28 et Figure 29). Ainsi, par exemple, avec la souche fongique *Antrodia* qui est une souche issue des régions tropicales, connue pour sa très grande agressivité envers le bois, les éprouvettes témoins présentent une perte de masse de 30% alors que les éprouvettes traitées avec le N,N,N-triméthylchitosane et qui ont subi un lessivage ne présentent aucune perte de masse (Figure 29).

La Figure 30 présente les photos des éprouvettes témoins et des éprouvettes traitées avec le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane et lessivées, et cela après 8 semaines d'incubation avec les souches fongiques étudiées.

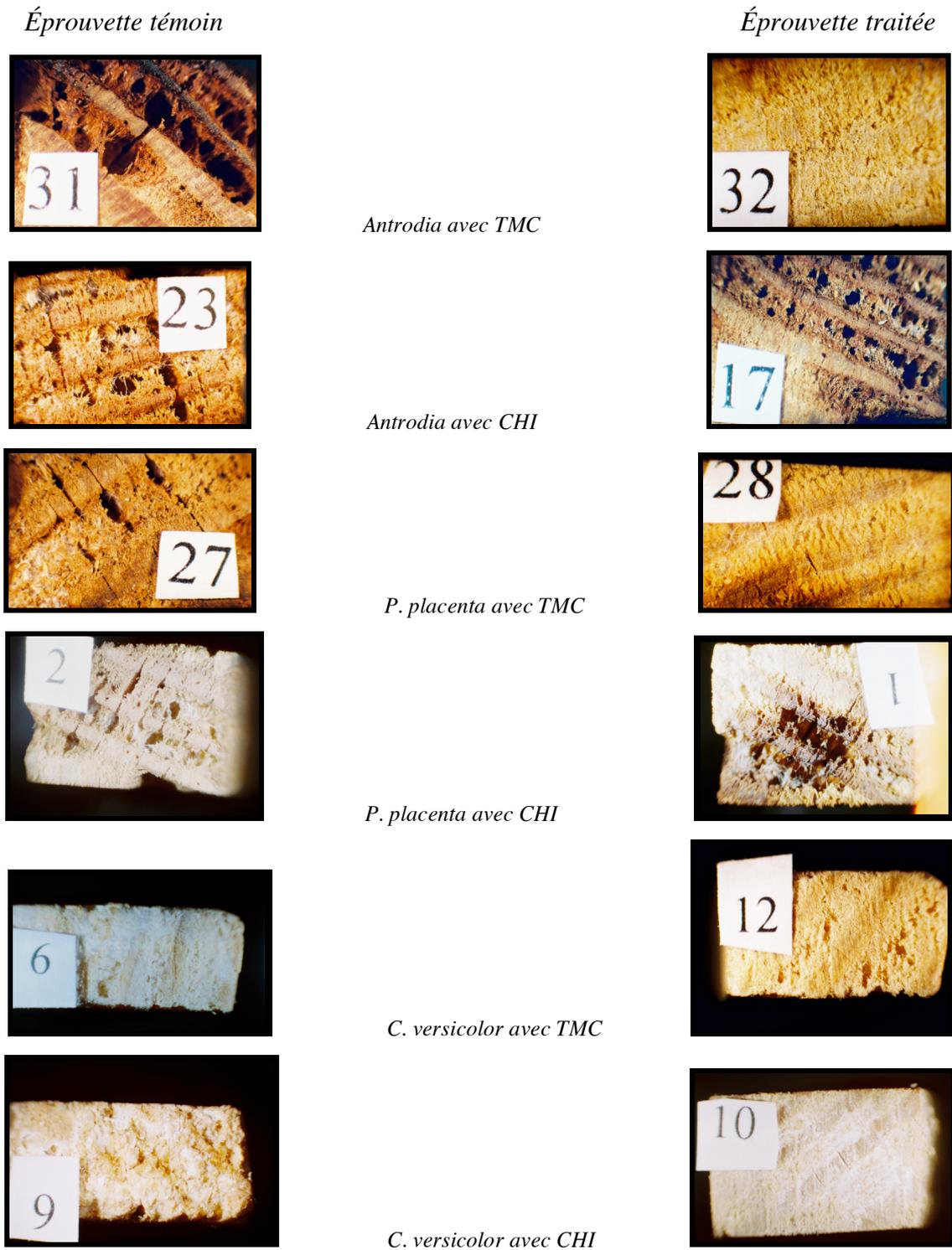


Figure 30 : Aspects des éprouvettes témoins et des éprouvettes traitées avec le chitosane (CHI) ou le N,N,N-triméthylchitosane (TMC) et lessivées, après incubation pendant 8 semaines, avec un agrandissement de 14 fois.

La Figure 30 montre que le mycélium de la souche fongique *Coriolus versicolor* ne se développe pas sur les éprouvettes traitées avec le N,N,N-triméthylchitosane. Par contre cette souche a totalement envahi les éprouvettes témoins et les éprouvettes traitées avec le chitosane. Avec les autres souches fongiques (*P. placenta* et *Antrodia*) les éprouvettes traitées avec le N,N,N-triméthylchitosane ne présentent aucune dégradation alors que celles traitées avec le chitosane présentent des dégradations (apparition des trous dans l'éprouvette) comparables à celles obtenues avec des éprouvettes témoins.

Cette constatation et l'obtention de perte de masse nulle pour les éprouvettes traitées laissent penser que le N,N,N-triméthylchitosane a **une action inhibitrice** sur la croissance des souches fongiques étudiées.

Une analyse par microscopie électronique des éprouvettes traitées avec le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane (Figure 31), a montré que le mycélium de la souche fongique *C. versicolor* a envahi l'éprouvette témoin et l'éprouvette traitée avec du chitosane dans tout leur volume, alors qu'en présence du N,N,N-triméthylchitosane il n'y a eu que quelques filaments qui ont pu intégrer l'éprouvette. Ces résultats montrent bien que l'action du N,N,N-triméthylchitosane contre les souches fongiques étudiées est une action inhibitrice.

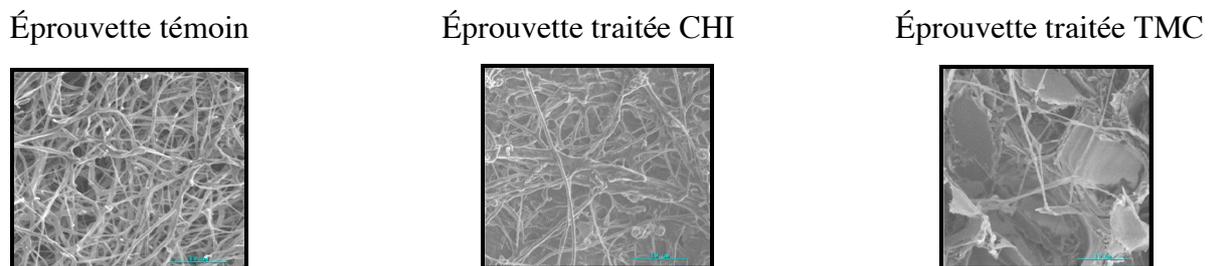


Figure 31 : Images en microscopie électronique d'une éprouvette témoin et des éprouvettes traitées avec le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane après attaque fongique du *C. Versicolor* (x1000).

L'action inhibitrice du N,N,N-triméthylchitosane sur les souches fongiques étudiées ne se fait pas seulement au niveau des zones adjacentes des éprouvettes traitées, mais elle atteint toute la boîte de Pétri, ce qui explique l'obtention de perte de masse nulle même pour des éprouvettes témoins (Figure 28).

Cependant le lessivage limite cette action seulement aux zones adjacentes des éprouvettes traitées, car il diminue le taux de diffusion du N,N,N-triméthylchitosane.

6.4. Étude de l'action du N,N,N-triméthylchitosane sur la croissance des souches fongiques.

Les résultats obtenus précédemment laissent penser que le N,N,N-triméthylchitosane a une action inhibitrice sur la croissance des souches fongiques.

Pour vérifier cette hypothèse, des boîtes de Pétriensemencées avec les spores des souches fongiques étudiées ont été enrobées avec 6 ml d'une solution du N,N,N-triméthylchitosane à $24,8 \cdot 10^{-3}$ équivalent/l en motifs quaternaires. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 32.

Sans TMC

Avec TMC



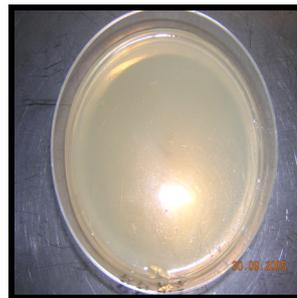
Antrodia



P. sanguineus



P. placenta



C. versicolor



Figure 32 : Action du N,N,N-triméthylchitosane (TMC) sur les souches fongiques étudiées après 8 jours d'incubation.

Le choix de $24,8 \cdot 10^{-3}$ équivalent/l en motifs quaternaires comme concentration n'est pas fortuit, puisque le nombre de motif quaternaire ajouté dans cette étude sous forme d'enrobage, soit $14 \cdot 10^{-5}$ mol, correspond au nombre de ces motifs présents dans chaque éprouvette de bois traitée avec le N,N,N-triméthylchitosane.

La présence du N,N,N-triméthylchitosane, même en très faible quantité ($14 \cdot 10^{-5}$ équivalent en motif quaternaire), inhibe complètement la croissance de toutes les souches fongiques étudiées.

Le mécanisme d'inhibition de la croissance des souches fongiques par le N,N,N-triméthylchitosane est à ce jour mal connu. Néanmoins, une hypothèse proposée par plusieurs chercheurs (C. H. kim *et al* 1997, Z. Jia *et al* 2001, J. K. Lee *et al* 2002, , M.R.Avadi *et al* 2004) met en avant la charge positive, portée par le groupement ammonium.

Selon cette hypothèse l'action inhibitrice du N,N,N-triméthylchitosane est due essentiellement aux interactions électrostatiques entre les charges positives de ces motifs quaternaires et les charges négatives des phospholipides éléments constitutifs de la membrane cellulaire des micro-organismes. Ces interactions entraînent des anomalies morphologiques, qui peuvent être précurseur de la mort de la cellule microbienne.

6.5. Conclusion.

La grande efficacité que présente le N,N,N-triméthylchitosane contre les souches fongiques étudiées : *Coriolus versicolor*, *Poria placenta*, *Picnoporus sanguineus* et *Antrodia*, et qui sont issues de deux régions (tempérée et tropicale), ajoutée à sa biodégradabilité et son caractère non-toxique, laissent penser qu'il pourra constituer un très bon produit de préservation du bois.

Le N,N,N-triméthylchitosane pourra être utilisé comme produit de préservation du bois aussi bien pour les classes à faible risque telle que les classe 1 et 2 ou pour les classes à risque élevé comme les classes 3 et 4, puisqu'il présente une bonne résistance au lessivage.

L'action antifongique du N,N,N-triméthylchitosane est due essentiellement aux interactions électrostatiques entre les charges positives des motifs quaternaires et les charges négatives présentes sur la membrane des souches fongiques. Néanmoins, cette action peut être due aussi à d'autres éléments.

Pour déterminer ces éléments qui peuvent s'ajouter aux interactions électrostatiques, l'évaluation de l'activité antifongique d'autres dérivés quaternaires du chitosane comme le N-

heptyl-N,N-diméthylchitosane) ou le N,N,N-triméthylglucosamine, pourra constituer une bonne perspective de recherche.

Chapitre 7. Étude des bioemballages.

Afin de réduire le volume de déchets de matériaux d'emballages synthétiques à base de polymères d'origine pétrochimique qui posent un problème environnemental, l'élaboration de nouveaux emballages comestibles ou biodégradables à usage alimentaire constitue une alternative très intéressante en complément au recyclage.

Les matériaux comestibles ou biodégradables sont constitués de macromolécules renouvelables, d'origine naturelle, appelées biopolymères, comme les polysides (cellulose et dérivés, amidon et dérivés), les protéines (gélatine, gluten), les composés lipidiques (cires, acides gras) etc.

Ces matériaux peuvent être éventuellement supports d'additifs alimentaires ou d'agents antimicrobiens.

Dans un souci d'élaborer un matériau présentant à la fois un caractère biodégradable et antimicrobien, l'hydroxypropylcellulose (HPC) qui est un dérivé de cellulose très utilisé en agroalimentaire a été associé au chitosane et au N,N,N-triméthylchitosane.

Une évaluation de l'activité anti-bactérienne des films obtenus, de leur sensibilité à l'eau vapeur ou liquide ainsi que de leurs propriétés mécaniques, a été réalisée.

7.1. Bioactivité des matériaux élaborés.

7.1.1. Activité anti-bactérienne des bioemballages.

a) *Étude de l'activité antibactérienne des films.*

Dans cette étude, un milieu gélosé a été utilisé en tant que modèle de produit alimentaire. La contamination en surface a été réalisée par étalement de 30 à 300 unités formant colonie (UFC) de *L. monocytogenes* ou *S. typhimurium*.

La bioactivité des films d'HPC, d'HPC associé à du chitosane (HPC-CHI) ou d'HPC associé à du N,N,N-triméthylchitosane (HPC-TMC) a été évaluée.

Les résultats sont présentés sur le Tableau 14. L'incorporation de N,N,N-triméthylchitosane dans une matrice d'HPC a permis d'obtenir une grande activité antibactérienne, que ce soit contre *L. monocytogenes*, avec 90 % d'inhibition ou contre *S. typhimurium*, avec 100 % d'inhibition.

Pour les films obtenus par incorporation du chitosane dans l'HPC, la détermination des taux d'inhibition n'a pu être réalisée à cause de l'obtention d'une opacité après l'incubation ne permettant pas un dénombrement bactérien.

Pour remédier à ce problème, l'activité antibactérienne des enrobages d'HPC, d'HPC-CHI et d'HPC-TMC a été évaluée par la suite.

Tableau 14 : Activité anti-bactérienne des films d'HPC, d'HPC/CHIT et d'HPC/TMC des *L. monocytogenes* et *S. typhimurium*.

Films	HPC	HPC-CHI	HPC-TMC
Inhibition de <i>L.monocytogenes</i> (%)	0	ND	91 ± 1
Inhibition de <i>S. typhimurium</i> (%)	0	ND	100 ± 0

ND : non-défini.

b) *Étude de l'activité antibactérienne des enrobages.*

Comme précédemment la contamination a été réalisée également par 30 à 300 UFC de *L. monocytogenes* ou de *S. typhimurium*.

L'enrobage d'HPC, d'HPC-CHI ou d'HPC-TMC a été formé en déposant directement la solution filmogène sur la surface gélosée.

Après séchage de l'enrobage et incubation, le taux d'inhibition est déterminé comme précédemment.

Tableau 15 : Activité anti-bactérienne des enrobages à base d'HPC, d'HPC-CHI et d'HPC-TMC sur les bactéries *L. monocytogenes* et *S. typhimurium*.

Enrobages	HPC	HPC-CHI	HPC-TMC
Inhibition de <i>L.monocytogenes</i> (%)	0	96 ± 10	96 ± 1
Inhibition de <i>S. typhimurium</i> (%)	0	99 ± 3	100 ± 0

Les résultats dans cette étude sont présentés Tableau 15. Les films d'HPC-CHI et d'HPC-TMC ont tous deux une très bonne activité antibactérienne et cela aussi bien contre *L. monocytogenes* que contre *S. typhimurium*, puisque, dans les deux cas le taux d'inhibition avoisine les 100 %.

Cependant, cette forte bioactivité peut être seulement due à la faible charge bactérienne initiale (de 30 à 300 UFC).

Afin de comparer l'activité du chitosane et du N,N,N-triméthylchitosane en présence d'une plus forte contamination, une étude en milieu liquide sur *Listeria innocua* (bactérie non-pathogène) a été réalisée, puisqu'il est impossible d'effectuer cette étude sur milieu solide du fait de dénombrement difficile avec une charge supérieure à 300 UFC..

7.2. Étude comparative entre l'action du chitosane et celle du N,N,N-triméthylchitosane sur *Listeria innocua* en milieu liquide : phase de latence.

Dans le cadre de ces travaux *Listeria innocua* a été sélectionnée en tant que souche modèle de *L. Monocytogenes*, du fait de sa non pathogénicité. Le biocide, chitosane ou N,N,N-triméthylchitosane ont été ajoutés en phase de latence avec une concentration de $6 \cdot 10^{-3}$ mol/L en motif amine ou motif quaternaire.

Le suivi de la croissance bactérienne a été effectué par dénombrement périodique.

Nous avons choisi de travailler avec une concentration en motifs actifs (motif amine pour le chitosane et motif quaternaire pour le N,N,N-triméthylchitosane) afin de pouvoir comparer l'action antibactérienne du chitosane à celle du N,N,N-triméthylchitosane. Travailler avec des concentrations massiques, comme c'est le cas dans la littérature, conduit à comparer ce qui est incomparable, puisque une même masse de chitosane et de N,N,N-triméthylchitosane ne correspond pas aux même nombre de motifs actifs, or, ce sont ces motifs actifs qui sont responsables en grande partie de l'activité antibactérienne de ces deux composés.

Ainsi, par exemple, 1 g de chitosane correspond à $6 \cdot 10^{-3}$ mol de motifs amines, par contre, 1 g du N,N,N-triméthylchitosane avec un degré de quaternisation de 100 % correspond à $2,9 \cdot 10^{-3}$ mol de motifs quaternaires.

Les résultats obtenus dans cette étude sont présentés sur la Figure 33.

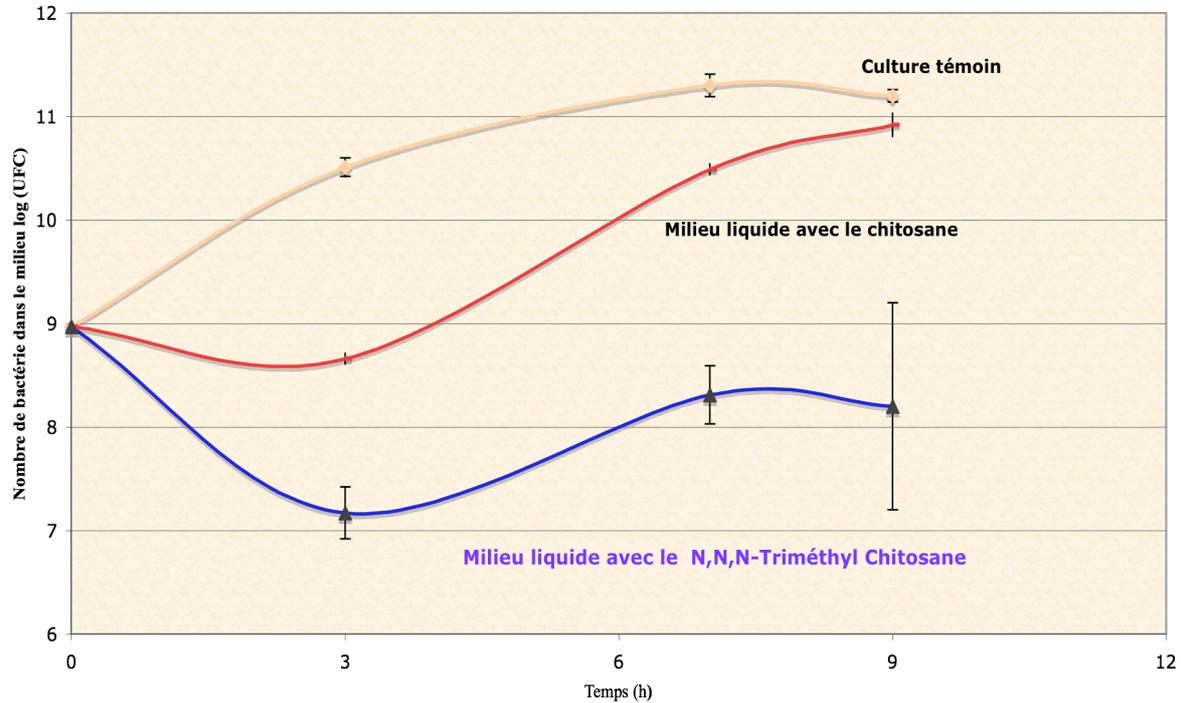


Figure 33 : Étude comparative de l'action du chitosane et celle du N,N,N-triméthylchitosane sur *L. innocua* en milieu liquide (phase de latence).

Cette étude comparative a montré que l'activité antibactérienne du N,N,N-triméthylchitosane est supérieure à celle du chitosane.

Ainsi, le nombre de bactéries dans la culture témoin passe au bout de 3 h d'incubation de $10^{8,97}$ UFC à $10^{10,51}$ UFC, alors qu'en présence du N,N,N-triméthylchitosane une élimination de 31,6 % des bactéries a été obtenue. Avec le chitosane, une diminution de 17,6 % du nombre des bactéries a été observée toujours 3 heures d'incubation.

Après 9 h d'incubation, le taux d'inhibition obtenu avec le chitosane n'était plus que de 2,5 %, alors qu'en présence du N,N,N-triméthylchitosane 26,8 % était toujours observé, avec donc un nombre de bactéries bien inférieur à celui initialement ajouté ($10^{8,97}$ UFC).

La reprise de croissance des bactéries en présence du chitosane peut être expliquée par l'apparition de bactéries résistantes à l'action du chitosane. Cette reprise de la croissance bactérienne a été observée par plusieurs auteurs, ainsi S. Roller et N. Covill (1999) ont montré qu'une solution du chitosane avec une concentration de $3 \cdot 10^{-3}$ mol/L en motif actif engendre des anomalies morphologiques sur la membrane cellulaire des moisissures

Zygosaccharomyces bailii et cela au bout de 45 s. Cependant, ces anomalies morphologiques (perforations) ont disparu au bout de 10 min d'incubation, ce qui montre que ces souches fongiques ont développé une certaine résistance au chitosane.

L'addition du N,N,N-triméthylchitosane a entraîné aussi une chute de la charge bactérienne, cependant l'effet inhibiteur qu'il a engendré est plus durable dans le temps que celui induit par la présence du chitosane, puisque même après 9 h d'incubation, le nombre de bactéries était toujours inférieur à celui ajouté à initialement.

Outre la présence d'ammonium quaternaires, avec charges cationiques indépendantes du pH de la solution, la différence d'efficacité entre le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane envers *L. innocua* peut aussi être due à un degré de polymérisation plus faible du N,N,N-triméthylchitosane, puisque la quaternisation s'accompagne d'une dépolymérisation (D. Snyman *et al* 2002).

Un matériau d'emballage a pour fonction principale la protection d'une denrée alimentaire. À ce titre, il doit être une barrière entre l'environnement extérieur et le produit lui-même et ainsi avoir des propriétés barrières et mécaniques adaptées. Dans la suite de ce travail, certaines caractéristiques physico-chimiques des bioemballages à base d'HPC ont été évaluées.

Du fait de l'hydrophilie naturelle des matrices et son impact négatif sur les propriétés barrières à la vapeur d'eau, la sensibilité à l'eau des matériaux bioactifs a été évaluée en priorité.

7.3. Sensibilité des bioemballages à l'eau à l'état vapeur et liquide.

7.3.1. Sensibilité des bioemballages à la vapeur d'eau.

Les coefficients de transfert à la vapeur d'eau (CTVE) des bioemballages sont déterminés suivant la norme AFNOR NF 2528 (1989) basée sur une méthode gravimétrique à une température de 23 ± 1 °C et une humidité relative de 50 ± 5 % HR. Ces conditions expérimentales, plus proches des applications courantes en agroalimentaire, permettent de simuler le comportement des films dans des conditions rencontrées couramment en conservation des aliments. Les CTVE sont donnés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Les coefficients de transfert de la vapeur d'eau ($\text{g.m}^{-2}.\text{Jour}^{-1}.\text{atm}^{-1}$) mesurés pour des films de 50 cm^2 de surface à 0-50 % d'HR et $23 \text{ }^\circ\text{C}$. Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions suivies de leurs intervalles de confiance ($p = 95 \%$).

Film	HPC	HPC/CHI	HPC/TMC
CTVE ($\text{g.m}^{-2}.\text{J}^{-1}.\text{atm}^{-1}$)	144 ± 10	170 ± 15	188 ± 12

L'incorporation des agents antibactériens a un impact significatif sur le transfert de la vapeur d'eau du film d'HPC.

L'incorporation du chitosane a conduit à une augmentation de 18 %, celle du N,N,N-triméthylchitosane, qui est un composé hydrophile, a augmenté encore plus le CTVE (30 %).

Les propriétés barrières à la vapeur d'eau des films d'HPC dépendent essentiellement du degré de substitution, puisque plus ce degré augmente plus le caractère barrière à la vapeur d'eau diminue (C. M. Crystal *et al* 1999). L'eau absorbée sur des films d'HPC forme soit une monocouche en surface du film pour les HPC à faible degré de substitution, soit elle envahit tout le volume du film pour d'HPC présentant un degré de substitution élevé (C. A. Lorenzo *et al* 2000).

La diminution des propriétés barrières à la vapeur d'eau des films d'HPC après addition du chitosane ou du N,N,N-triméthylchitosane est due au caractère hydrophile de ces deux composés et à la présence sur leur chaîne macromoléculaire de motifs volumineux qui laissent des espaces entre les chaînes et permettent ainsi le passage de molécules d'eau (Y. B. Wu *et al* 2004).

L'amélioration des propriétés barrières à la vapeur d'eau pourrait être obtenue par addition de composés plus hydrophobes.

Ainsi, Ayranci et Tunc (2001) ont associé acide stéarique et méthylcelluloses avec succès.

Sebti (2002) a étudié l'influence de l'incorporation des composés hydrophobes suivants : l'acide stéarique, l'acide oléique, le palmitate de méthyle et le stéarate de méthyle, sur les CTVE des bioemballages à base d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC). Dans cette étude, les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'acide stéarique à partir d'une teneur 10 % (m/mHPMC).

7.3.2. Sensibilité des bioemballages à l'eau liquide.

- *Angle de contact.*

Le mouillage qui se produit lorsqu'une goutte d'un liquide s'étale sur la surface d'un solide dépend des tensions interfaciales liquide/solide, liquide/air et air/solide, qui sont elles mêmes liées aux variations de l'angle de contact θ .

La sensibilité de la surface des films à l'eau liquide a été donc évaluée par mesure de l'angle de contact. La goniométrie est une mesure de l'énergie de surface. Dans la pratique, la nature hydrophile ou hydrophobe d'un film est déterminée en déposant une goutte d'eau à la surface du film et en mesurant l'angle de contact θ , qui varie de 0° pour des films hydrophiles à 90° pour des films hydrophobes.

Les angles de contact θ donnés dans le Tableau 17 montrent que l'introduction du chitosane ne change pas le caractère hydrophile naturel des films d'HPC.

Par contre, la présence du N,N,N-triméthylchitosane entraîne une légère augmentation dans l'angle de contact (une augmentation de 7 %). Cependant, cette augmentation reste faible et ne change pas le caractère hydrophile des films d'HPC.

Tableau 17 : Angles de contact θ mesuré à l'interface eau-film. Les valeurs sont des moyennes de 5 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p=95 %).

	Film d' HPC	HPC-CHI	HPC-TMC
Angle θ	59 ± 5	59 ± 6	63 ± 5

L'angle de contact obtenu dans notre étude pour les films d'HPC est identique à celui obtenu par J.Bajdik *et al* (2005) sur un support obtenu par compression de poudre d'HPC présentant un faible poids moléculaire (95000 Da), ce qui laisse penser que le poids moléculaire d'HPC influence peu l'angle de contact.

- *Teneur en eau et hydrosolubilité des films.*

Les films d'HPC, HPC-CHI et HPC-TMC présentent tous la même teneur en eau, soit 4 % (m/m).

L'hydrosolubilité est un paramètre important qui peut conditionner les applications des films d'HPC dans l'agroalimentaire.

Les films homogènes à base d'HPC, les films d'HPC-CHI et les films d'HPC-TMC sont tous totalement solubles dans l'eau. Cette solubilité dans l'eau est compréhensible, à la vue du caractère hydrophile aussi bien de l'HPC que du chitosane (sous forme protonée) ou du N,N,N-triméthylchitosane.

Au vu de l'impact de l'ajout de biocide sur les propriétés barrières à la vapeur d'eau, la suite de notre étude a consisté à déterminer cet impact sur les propriétés mécaniques en traction, propriétés conditionnant également le domaine potentiel d'application de ces biomatériaux.

- *Propriétés mécaniques.*

La plage de déformation élastique et plastique ainsi que la résistance à la rupture sont des caractéristiques importantes pour les bioemballages puisqu'ils ont un rôle de protection de l'intégrité des aliments. La résistance mécanique a été étudiée en traction par la mesure de trois paramètres souvent utilisés dans la littérature : la force à la rupture (FR), l'élasticité par le module de Young (Y) et le pourcentage d'allongement (A). Les résultats sont présentés dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Propriétés mécaniques des films d'HPC, HPC-CHI et HPC-TMC.

Film	HPC	HPC-CHI	HPC-TMC
Y (MPa)	290 ± 23	417±65	317 ± 162
FR (MPa)	17 ± 3	18 ± 10	15 ± 3
A(%)	90 ± 14	50 ± 12	80 ± 38

Les résultats obtenus montrent que la présence du chitosane et du N,N,N-triméthylchitosane augmente le module d'élasticité des films, ainsi l'ajout de chitosane a conduit à une augmentation de 44 % alors que le N,N,N-triméthylchitosane, de 10 %. L'association avec de tels composés conduit ainsi à des matériaux globalement plus rigides.

La force à la rupture est à l'inverse restée pratiquement inchangée après l'incorporation du chitosane et du N,N,N-triméthylchitosane.

Les films d'HPC présentent une phase plastique très grande, puisque le pourcentage d'allongement obtenu était égal à 90 %. L'incorporation du chitosane et du N,N,N-triméthylchitosane a entraîné une diminution de cette plasticité. Il est toutefois possible d'améliorer la plasticité de ce type de matériaux par addition d'agent de couplage comme le 1,4-diisocyanatobutane (P.L.Almeida *et al* 2002).

Toutefois, les résultats ne permettent pas de conclure sur l'influence de l'addition des biocides sur les propriétés mécaniques puisque les films d'HPC-CHI et HPC-TMC présentent une grande variabilité (écart-type élevé) qui peut être due à une distribution non-uniforme du biocide au sein de la matrice HPC.

7.4. Conclusion.

La modification chimique du chitosane a permis d'obtenir un composé (TMC) très soluble dans l'eau et dont l'activité antibactérienne est meilleure.

L'incorporation du chitosane et du N,N,N-triméthylchitosane dans une matrice d'HPC a permis l'élaboration de bioemballages antibactériens très performants et dont les propriétés barrières à la vapeur d'eau, l'interaction avec l'eau liquide et les propriétés mécaniques diffèrent peu de ceux des films à base d'HPC.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Cette étude comportait trois objectifs, (1) la synthèse d'un biocide par modification chimique du chitosane, (2) l'application du biocide synthétisé à la préservation du bois et enfin (3) l'application du biocide synthétisé dans la conception d'emballages antibactériens.

Dans un premier temps, la modification chimique du chitosane a été réalisée en deux étapes, une alkylation avec du formaldéhyde et une quaternisation par l'iodométhane. Le N,N,N-triméthylchitosane ainsi obtenu, présente un degré de quaternisation de 96 % et une solubilité totale dans l'eau. Cette quaternisation a ainsi permis de s'affranchir de l'acide éthanoïque, normalement utilisé en tant que solvant du chitosane.

La deuxième partie de cette étude a montré que la modification chimique du chitosane conduit à une augmentation de son activité antifongique ce qu'a permis d'améliorer la durabilité du bois vis-à-vis des champignons basidiomycètes. Ainsi, le traitement du bois par le N,N,N-triméthylchitosane a conduit à sa préservation contre l'attaque de souches fongiques telles que *C. versicolor*, *Picnoporus sanguineux*, *Poria placenta* et *Antrodia*. Enfin, il a été montré que le N,N,N-triméthylchitosane avait une bonne résistance au lessivage, signifiant ainsi que son utilisation pourrait être envisagée dans des classes de risques élevées.

Dans la troisième partie de cette étude, la comparaison de la bioactivité du chitosane et du N,N,N-triméthylchitosane a été réalisée en milieu liquide sur *Listeria innocua* en tant que bactérie modèle. Les résultats ont montré que la quaternisation du chitosane augmente non seulement l'activité antimicrobienne initiale mais également la durée de cette bioactivité. Le chitosane et le N,N,N-triméthylchitosane ont été par la suite incorporés dans l'hydroxypropylcellulose (HPC) pour l'élaboration de biomatériaux potentiellement antibactériens. Les films ainsi obtenus ont présenté une très grande efficacité antibactérienne contre *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium*. Une étude « interactions eau-matériau » a été réalisée à partir des films d'HPC, d'HPC-chitosane et d'HPC-N,N,N-triméthylchitosane avec l'eau liquide et l'eau vapeur. Cette étude a montré que l'incorporation du chitosane ou du chitosane modifié dans la matrice HPC conduisait à une légère réduction de ses propriétés barrières à la vapeur d'eau, mais n'avait aucune influence sur la solubilité des films qui restait totale. Enfin, l'étude des propriétés mécaniques des biomatériaux a montré que l'association de l'HPC au chitosane ou au chitosane modifié chimiquement augmentait le module d'élasticité des films et que la résistance à la rupture restait pratiquement inchangée.

PARTIE

EXPERIMENTALE

Chapitre 8. METHODES D'ANALYSES.

8.1. Spectroscopie d'Infra-Rouge (FTIR).

Les spectres IR du chitosane et du N-méthylchitosane ont été enregistrés sur un appareil Perkin-Elmer-Paragon 1000 PC à transformée de Fourier à partir de pastilles de KBr, avec un pourcentage massique de 1% en produit à analyser .

Avant de préparer les pastilles la granulométrie du chitosane et du N-méthylchitosane est réduite au maximum par broyage dans un mortier.

8.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

Les spectres RMN ^1H ont été enregistrés sur un appareil Bruker AVANCE 300 en utilisant 40 à 50 mg de N,N,N-triméthylchitosane dans D_2O .

8.3. Détermination du degré de quaternisation du N,N,N-triméthylchitosane.

La détermination du degré de quaternisation du N,N,N-triméthylchitosane est effectuée par dosage des ions iodures. Le mode opératoire utilisé est le suivant :

- Une masse m_0 du N,N,N-triméthylchitosane est solubilisée dans 20 ml d'eau distillée.
- Addition de 20 ml d'une solution de Br_2 à 0,1 M.
- Agitation pendant 5 min à température ambiante.
- Addition de 10 ml d'une solution de NaOH à 1M.
- On laisse reposer pendant 5 min.
- Addition de 2 ml de formaldéhyde HCHO à 37 % (m/m).
- Agitation pendant 15 min à température ambiante.
- Addition de 5 ml de CH_3COOH à 100%.
- Addition de 10 ml d'une solution de KI à 10 %(m/m).
- L'iode ainsi formé est titré avec une solution de bisulfite de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ à 0,1 M.

Le degré de quaternisation est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Degré de quaternisation (\%)} = \left[\frac{n_{\text{exp}}(\text{I})}{n_{\text{th}}(\text{I})} \right] \times 100.$$

$n_{\text{exp}}(\text{I}^-)$ est le nombre de mole des ions iodures correspondant à la masse m_0 du N,N,N-triméthylchitosane, obtenu après dosage avec le bisulfite de sodium.

$n_{\text{th}}(\text{I}^-)$ est le nombre de mole théorique des ions iodures, correspondant à la même masse m_0 du N,N,N-triméthylchitosane.

8.4. Dosage de l'azote du chitosane par la méthode de Kjeldahl.

La méthode de Kjeldahl est applicable pour le dosage de l'azote, des différents composés organiques azotés comme les amines et les sels d'ammoniums quaternaires.

Le dosage se fait en deux étapes :

- Première étape : L'ammoniac des composés azotés est libéré en les traitant à l'ébullition par l'acide sulfurique concentré, en présence de catalyseur à base de sulfate de cuivre, de sélénium, et de sulfate de potassium. L'acide sulfurique agit comme oxydant et détruit la molécule organique ; le carbone se dégage sous forme de CO_2 , l'hydrogène sous forme de H_2O , et l'azote reste en solution sous forme de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Cette phase, qui consiste à transformer l'azote organique en azote minéral, s'appelle minéralisation.
- Deuxième étape : Dans cette étape, le sulfate d'ammonium est transformé en ammoniac par addition de l'hydroxyde du sodium, l'ammoniac libéré est ensuite récupéré dans une solution d'acide fort ; l'excès d'acide est dosé par une base forte.

Chapitre 9. SYNTHÈSE.

9.1. Produits chimiques utilisés pour ce travail

- Chitosane 244 avec un degré de déacétylation 98% et une masse moléculaire de $M_w = 4.10^5$ g/mol (France chitine).
- Acide acétique à 100 % en masse, (Prolabo).
- Formaldéhyde à 37 % en masse, (Aldrich).
- Borohydrure de sodium à 99 % en masse, (Aldrich).
- Hydroxyde de sodium, (Fischer Chemicals).
- Éthanol 96 % en volume, (Xilab).
- Diéthyléther à 100 % en masse, (Fischer Chemicals).
- N-méthyl-2-pyrrolidinone à 99 % en masse, (Aldrich).
- Iodure de sodium, (Aldrich).
- Iodure de potassium, (Prolabo).
- Iodométhane à 99 % en masse, (Aldrich).
- Acétone, (Xilab).
- Brome (Aldrich),
- Bisulfite de sodium (SDS).

Ces produits ont été utilisés sans purification supplémentaire, excepté le chitosane qui est dissout dans une solution à 2,5 % d'acide acétique, et filtré.

9.2. Synthèse du N-méthylchitosane.

Une masse de 4 g de chitosane est dissoute dans 400 ml d'une solution d'acide acétique à 1%. Après cette dissolution, une filtration est effectuée pour éliminer les impuretés. À la solution obtenue, le formaldéhyde est ajouté en quantité égale à 3 fois le nombre de mole des amines du chitosane. Après cette addition, la solution est agitée pendant 30 minutes, à température ambiante. Ensuite 0,33 g de NaBH_4 est ajouté à cette solution et l'agitation est réalisée pendant 60 min, toujours à température ambiante. Le pH est ajusté à 10 par ajout de NaOH à 1M. Le précipité ainsi obtenu est filtré puis lavé jusqu'à un pH = 7. Enfin, l'excès de réactifs est éliminé par extraction avec un soxhlet en utilisant un mélange d'éthanol et du diéthyléther (80 % / 20 % en volume) et cela pendant 24 à 48 heures.

Le produit obtenu est séché à l'air libre pendant 24 h.

9.3. Synthèse du N,N,N-triméthylchitosane.

Le N-méthylchitosane ainsi obtenu est dispersé dans 120 ml de N-méthyl-2-pyrrolidinone en présence de 5 g de NaI à une température de 60 °C, sous une forte agitation, pendant 1h.

Après cette dispersion, 22 ml de NaOH à 15 % et d'iodométhane sont ajoutés. La quantité d'iodométhane ajoutée (en mole) est égale à 10 fois l'amine du chitosane. Le mélange ainsi obtenu est chauffé à 60 °C pendant 6 h, sous une forte agitation.

Enfin l'ammonium quaternaire du chitosane est précipité par addition d'acétone (3 fois le volume du N-méthyl-2-pyrrolidinone). Le produit ainsi obtenu est séché avec P₂O₅.

Chapitre 10. PRÉSERVATION DU BOIS.

L'évaluation de l'efficacité antifongique du chitosane et du N,N,N-triméthylchitosane est effectuée selon un protocole expérimental inspiré de la norme européenne EN 113 (1986).

Les souches fongiques utilisées dans cette étude appartiennent à deux régions : région tempérée et région tropicale.

La région tempérée a été représentée par les souches suivantes :

- *Coriolus versicolor* encore appelé *Trametes versicolor*, qui dégrade aussi bien la lignine que les polysaccharides. Cette souche a été isolée au CIRAD et elle a pour référence (1000/2)
- *Poria placenta* qui s'attaque principalement aux polysaccharides et dans une moindre mesure à la lignine. Cette souche a été isolée au CIRAD et elle a pour référence (1000/2)

La région tropicale a été représentée par les souches fongiques suivantes :

- *Picnoporus sanguineus*, souche isolée au CIRAD et elle a pour référence (1969/1).
- *Antrodia*. souche isolée au CIRAD et dont la référence est (2304/1).

La culture de ces souches fongiques se fait sur du Malt-agar (45 g/l, Difco) .

10.1. Echantillonnage.

Les éprouvettes utilisées sont des éprouvettes de Pin sylvestre (*Pinus sylvestris*). Leurs dimensions initiales sont de 7,5 x 12,5 x 25 mm, selon les directions radiale, tangentielle et longitudinale. Les éprouvettes sont séchées à l'étuve à 80°C pendant 3 jours puis pesées à 0,01 g près pour déterminer leur masse initiale (m_0).

10.2. Traitements des éprouvettes.

Les éprouvettes sont imprégnées selon un procédé vide/pression. Les blocs de bois sont placés dans un récipient qu'on introduit à l'intérieur d'un dessiccateur équipé d'un robinet à deux voies puis soumis à un vide de 7 mbar pendant 15 min de façon à chasser l'air contenu dans le bois. La solution de traitement est alors introduite par aspiration jusqu'à ce que les éprouvettes soient totalement recouvertes, puis la pression atmosphérique est rétablie. Les éprouvettes sont maintenues immergées pendant deux heures avant d'être égouttées à l'air libre, puis séchées pendant trois jours dans une étuve à 80 °C.

Les solutions de traitement utilisées sont :

- Solution du chitosane à 2 % (m/m) dans l'acide acétique à 2.5 % (m/m).
- Solution du N,N,N- triméthylchitosane à 4 % (m/m) dans l'eau distillée.

La masse m_1 est la somme de la masse du bois et la masse du produit de traitement, on peut alors calculer le pourcentage de produit retenu dans le bois ou gain de masse.

$$\text{Taux de traitement (kg/m}^3\text{)} = m_1 - m_0 / V_{\text{éprouvette}}$$

10.3. Lessivage, séchage et conditionnement des éprouvettes.

Les éprouvettes traitées et séchées ont été soumises à un lessivage selon la norme française NF X41-565. Chaque éprouvette est placée dans un récipient contenant cinq fois son volume d'eau distillée et soumise à une agitation mécanique. On effectue alors une première phase de macération en réalisant trois cycles de lessivage (1, 2, 4 heures) avec changement d'eau entre chaque cycle. Après cette première période, les éprouvettes sont séchées à l'air pendant 16 heures. Elles sont ensuite soumises à une deuxième phase de macération (trois cycles de lessivage pendant 8, 16 et 48 h) avec changement d'eau entre chaque cycle. Les éprouvettes sont ensuite séchées pendant trois jours dans une étuve à 80°C, puis pesées (m_2).

10.4. Détermination des taux de lessivage.

Pour le chitosane, le taux de lessivage est déterminé par dosage de l'azote dans les eaux de macération par Kjeldahl. Pour le N,N,N-triméthylchitosane les taux de lessivages sont déterminés par dosage des iodures dans les eaux de lessivage.

10.5. Cultures fongiques.

Les milieux malt-agar sont inoculés avec un fragment de culture âgée de 2 semaines. Les boîtes de Pétri sont incubées à 25 °C et à 75 % d'humidité relative dans une enceinte climatique, jusqu'à ce que le mycélium ait recouvert toute la surface de la boîte de Pétri (de 1 à 2 semaines en moyenne).

10.6. Répartition des éprouvettes et exposition aux souches fongiques.

Les éprouvettes préalablement séchées et pesées sont traitées avec l'UV pendant 30 minutes, afin de réduire toute contamination possible, ensuite elles sont introduites aseptiquement dans les boîtes de Pétri, directement sur le mycélium.

La répartition des éprouvettes est établie comme suit :

- Quatre éprouvettes traitées et non-lessivées, deux éprouvettes non-traitées et non-lessivées par boîte de Pétri et par souche fongique, pour évaluer la performance du traitement conférée aux éprouvettes.
- Quatre éprouvettes traitées et lessivées, deux éprouvettes non-traitées mais lessivées, par souche fongique, et cela pour évaluer la résistance de notre composé au lessivage.
- Quatre éprouvettes traitées, sur milieu gélosé non-inoculé avec une souche fongique pour évaluer les pertes de masse dues à la diffusion. Ces pertes de masse correspondent au coefficient de correction.

L'incubation des éprouvettes est réalisée à 25°C et 75% d'humidité relative, pendant 60 jours.

10.7. Examen des éprouvettes et évaluation de l'efficacité des traitements.

Après 8 semaines d'incubation, les éprouvettes sont retirées des boîtes de Pétri. Celles qui sont placées dans des cultures fongiques sont débarrassées du mycélium adhérent, séchées pendant 3 jours à 80°C (m_3), et pesées.

L'efficacité du traitement est estimée par la perte de masse des éprouvettes déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Perte de masse (\%)} = \left(\frac{m_0 - m_2}{m_2} \times 100 \right) - C$$

Ou m_0 est la masse initiale sèche des éprouvettes, m_2 la masse sèche des éprouvettes traitées ou non après 8 semaines d'incubation.

C est le coefficient de correction, et c est la moyenne des pertes de masse dues à la diffusion.

10.8. Tests de l'activité antifongique intrinsèque du N,N,N-triméthylchitosane en boîte de Pétri.

L'inoculation avec les souches fongiques est réalisée en surface d'un milieu gélosé. Les souches sont mises en suspension dans de l'eau physiologique. Un volume 0,2 mL est déposé à la surface et étalé au râteau. Les boîtes sont séchées sous hotte à flux laminaire (1h minimum), puis 6 ml d'une solution du N,N,N-triméthylchitosane à $24,8 \cdot 10^{-3}$ mol/L en motif quaternaire, sont déposées en surface sans racler. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées en chambre climatique (25°C ; 75%HR) pendant 8 jours. Le test a été effectué sur les souches fongiques suivantes :

- *Coriolus versicolor* (1000/2 CIRAD).
- *Poria placenta* (1000/2 CIRAD).
- *Picnoporus sanguineus* (1969/1 CIRAD).
- *Antrodia* (2304/1 CIRAD).

Chapitre 11. ÉTUDE DES BIOMEBALLAGES.

11.1. Fabrication des films par casting.

11.1.1. Films homogènes à base d'HPC.

9/200/100 (g/g/g) d'HPC/eau/éthanol 96 % (v/v) sont mélangés pendant quelques heures sous agitation magnétique 500 tpm. Les solutions filmogènes ainsi obtenues sont ensuite dégazées sous vide, coulées en support polypropylène et séchées toute la nuit à humidité relative (HR) ambiante. Les films sont stockés à 23 ± 1 °C et 50 ± 5 % HR pendant 2 semaines.

Une quantité initiale de 20 g de solution filmogène permet d'obtenir des films secs ayant une épaisseur de 30 ± 2 µm. Dix mesures ont été réalisées pour la détermination de l'épaisseur des films.

11.1.2. Films d'HPC associée à du chitosane ou au N,N,N-triméthylchitosane.

À la solution filmogène initialement préparée, 50 % (v/v) d'une solution du chitosane à 0,006 mol/L en motifs amines ou d'une solution de N,N,N-triméthylchitosane à 0,006 mol/L en motifs quaternaires sont ajoutés. Le mélange ainsi obtenu est ensuite dégazé, coulé, séché et stocké comme précédemment. Les films sont stockés à 23 ± 1 °C et 50 ± 5 % HR pendant 2 semaines. Une quantité initiale de 30 g de solution filmogène permet d'obtenir des films secs ayant comme épaisseur :

- HPC 50 % (v/v) + du chitosane 50 % (v/v) : 29 ± 2 µm.
- HPC 50 % (v/v) + du N, N,N- triméthylchitosane 50 % (v/v) : 29 ± 1 µm.

Dix mesures ont été réalisées pour la détermination de l'épaisseur des films.

L'épaisseur est mesurée avec un micromètre LORENTZEN & WELTRE.

11.2. Pré-culture de 18 h.

Les bactéries utilisées dans cette étude sont : *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* et *Salmonella typhimurium*.

Les pré-cultures sont obtenues en ensemençant des tubes de milieu stérile contenant 9 ml de milieu de culture (Trybtose Broth pour les *Listeria* et Nutrient Broth pour *S. typhimurium*) avec 1 ml de culture de 24 h.

Les tubes sont agités par un vortex et incubés à 37 °C pendant 18 h.

11.3. Activité anti-microbienne des films.

La contamination en surface est réalisée par étalement au râteau de 0,1 ml de la dilution 10^{-6} d'un bouillon de culture de 18 h en surface des boîtes de Petri de tryptose gélosé pour *Listeria monocytogenes*, et sur du Nutriant gélosé pour *Salmonella typhimurium*.

Les films d'HPC ou d'HPC associée à du chitosane (HPC/CHI) ou à du N,N,N-triméthylchitosane (HPC/TMC) sont déposés sur le milieu gélosé à l'aide d'une pince nettoyée préalablement avec l'éthanol. L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 h.

Le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit :

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[\frac{\text{nombre UFC en boîte témoin} - \text{nombre UFC en boîte d'essai}}{\text{nombre UFC en boîte témoin}} \right] \times 100$$

11.4. Activité anti-microbienne des enrobages.

La contamination en surface est réalisée par étalement au râteau de 0,1 ml de la dilution 10^{-6} d'un bouillon de culture de 18 h en surface de boîtes de Pétri de Tryptose gélosé pour *Listeria monocytogenes*, et sur du Nutriant gélosé pour *Salmonella typhimurium*.

Le film d'HPC, d'HPC/CHI ou d'HPC/TMC est formé avec 12 ml de la solution filmogène.

L'enrobage est séché pendant 5 h sous hotte à flux laminaire avant incubation à 37 °C pendant 24 heures. Trois répétitions ont été réalisées.

Le mode de détermination du pourcentage d'inhibition s'est effectué de la même manière que précédemment.

11.5. Étude de l'effet antibactérien du chitosane et du N,N,N-triméthylchitosane sur *Listeria innocua*.

1 ml d'un bouillon de culture de 18 h du *L. innocua* est ajouté à 100 ml d'un milieu de culture Tryptose Broth et cela en même temps ($t = 0$ h) que 10 ml d'une solution de chitosane à 6.10^{-3} mol/L en motif amine ou d'une solution du N,N,N-triméthylchitosane à 6.10^{-3} mol/L en motif

quaternaire, soit une concentration finale de $0,54 \cdot 10^{-3}$ mol /l en motif actif par rapport au milieu de culture. Le milieu est ensuite placé à 37 °C et agité à 140 tpm.

Le suivi de la croissance bactérienne est effectué par dénombrement périodique. Pour cela, 1ml du milieu de culture est prélevé, puis dilué dans l'eau physiologique (eau distillée contenant 9 ‰ (m/m) du NaCl). Enfin 0,1 ml de la dilution appropriée est étalée sur milieu tryptose gélosé. Quatre répétitions ont été effectuées.

11.6. Teneur en eau des films.

La teneur en eau est déterminée par séchage des films, dans une étuve à 105 °C, et cela jusqu'à obtention d'une masse constante. Les films sont préalablement conditionnés pendant une semaine à 23 ± 1 °C et 50 ± 5 %HR.

Teneur en eau % = [(masse initiale – masse finale) / masse initiale] x 100

Dans ce test, 5 répétitions ont été réalisées.

11.7. Solubilité des films dans l'eau.

La solubilité des films dans l'eau est mesurée par immersion des films dans 50 ml d'eau distillée pendant 24 h et à 25 °C.

La solubilité est exprimée en pourcentage par rapport au poids sec initial du film.

S % = [(masse initiale – masse finale) / masse initiale] x 100

11.8. Goniométrie ou mesure de l'angle de contact.

Une goutte d'eau distillée est déposée à la surface des films totalement lisses. L'angle de contact θ à l'interface eau/film est mesuré avec une précision de 1° dès le dépôt de la goutte au moyen d'un goniomètre KRUSS muni d'une micro-seringue, l'angle θ , variant de 0° pour des films hydrophobes à 90° pour des films hydrophiles.

Dans ce test, 5 répétitions ont été effectuées.

11.9. Étude de la sensibilité des films à la vapeur d'eau : Détermination du Coefficient de Transfert à la Vapeur d'Eau (CTVE).

Le CTVE des bioemballages est déterminé suivant la norme AFNOR NF ISO 2528 (1989), basé sur une méthode gravimétrique. Des coupelles en aluminium contenant 20 g de desséchant anhydre CaCl_2 sont recouvertes par des films de 50 cm^2 de superficie et par la cire au niveau des bordures. Les coupelles sont placées dans une enceinte climatique à température et humidité contrôlée respectivement à 23 ± 1 °C et 50 ± 5 % HR.

À partir de la courbe d'évolution de la masse de coupelles au cours du temps, les CTVE ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{j}^{-1}$) sont déterminés en régime stationnaire, selon la formule suivante :

$$\text{CTVE} = \text{quantité d'eau (g) prise par le film} \times 24 / \text{Variation du temps (j)} \times S (\text{m}^2).$$

Trois répétitions ont été réalisées et des coupelles témoins, sans desséchant, sont suivies en parallèle pour estimer la quantité d'eau absorbée par le film.

11.10. Propriétés mécaniques.

Les propriétés mécaniques des films : le module de Young (Y, MPa), la force à la rupture (FR, MPa) sont mesurés au moyen d'un tensiomètre Adamel Lhomargy selon la norme AFNOR NF ISO 1924-2 (1995). Cinq répétitions sont réalisées sur des films préalablement conditionnés pendant 2 semaines à 23 ± 1 °C et 50 ± 5 % en humidité relative. Les films fixés entre deux mâchoires, l'une fixe, l'autre mobile, d'une dimension de 25 mm x 60 mm, sont étirés de façon uniaxiale à une vitesse constante de 3 mm/min pour la détermination du module de Young et de 100 mm/min pour la mesure de la force à la rupture et l'allongement, et cela avec un module de 50 daN de capacité.

Y (MPa) module de Young = Pente de la courbe / section, avec la section qui est égale au produit de l'épaisseur du film par sa longueur,

FR (MPa) Force à la rupture = Force maximale / section.

A % = $(dl/l) \times 100$.

Références Bibliographiques

J. Ahtiainen, R. Valo, M. Jarvinen, A. Joutti (2002) « *Microbial Toxicity Tests and Chemical Analysis as Monitoring Parameters at Composting of Creosote contaminated soil* », Ecotoxicology and Environmental Safety, 53, 323-329.

P. L. Almeida, S. Tavares, A. F. Martins, M. H. Godinho, M. T. Cidade, J. L. Figueirinhas (2002) « *Cross linked hydroxypropylcellulose films : mechanical behaviour and electr-optical properties of PDLC type cells* », Optical Materials, 20, 97-100.

C. Altieri, M. Sinigaglia, M. R. Corbo, G. G. Buonocore, F. Falcone, M. A. Del Nobile (2004) « *Use of entrapped microorganisms as biological oxygen scavengers in food packaging applications* » LWT, 37, 9-15.

C. Alvarez-Lorenzo, J. L. Gomez-Amoza, R. M. Pacheco, C. Souto, A. Concheiro (2000) « *Evaluation of low-substituted hydroxypropylcellulose (L-HPC) as filler binders for direct compression* », International Journal of Pharmaceutics, 197, 107-116.

C. Alvarez-Lorenzo, J. L. Gomez-Amoza, R. M. Pacheco, C. Souto, A. Concheiro (2000) « *Interaction between hydroxypropylcellulose and vapour/liquid water* », European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 50, 307-318.

E. Amborabé, A. Aziz, P. T. Aziz, D. Quantinet, L. Dhuicq, G. Vernet (2004) « *Essais d'emploi du chitosan contre Botrytis cinerea* », Phytoma, la défense des végétaux, N°571.

P. Appendini, J. H. Hotchkiss (2001) « *Surface modification of poly styrene by attachment of antimicrobial peptide* », Journal of Applied Polymer Science, 81, 609-616.

M. R. Avadi, A. M. M. Sadeghi, A. Tahzibi, K. H. Bayati, M. Pouladzadeh, M. J. M. Mehr, M. R. Tehrani (2004) « *Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent : Synthesis characterization and antibacterial effects* », European Polymer Journal, 40, 1355-1361.

E. Ayranci, S. Tunc (2001) « *The effect of fatty acid content on water vapour and carbon dioxide transmissing of cellulose based edible films* », Food Chemistry, 72, 231-236.

W. M. Baird, L. A. Hooven, B. Mahadevan (2005) « *Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action* », Environmental and Molecular Mutagenesis, 45, 106-114.

H. M. Barnes, T. L. Amburgey, M. G. Sanders (2005) « *Performance of copper naphthenate and its analogs as ground contact wood preservatives* », Bioresource Technology, 96, 1131-1135.

A. Bégin, M. V. Calsteren (1999) « *Antimicrobial films produced from chitosan* », International Journal of Biological Macromolecules, 26, 63-67.

R. Belalia, S. Grelier (2002) « *Décontamination du bois traité avec le CCA par des complexants* », DEA Bordeaux 1.

J. P. Borges, M. H. Godinho, A. F. Martins (2004) « *Tensile properties of cellulose fiber reinforced hydrox propylcellulose films* », Polymer Composites, 25, 102-110.

C. Cervantes, J. C. Garcia, S. Devars, F. G. Corona, H. L. Tavera, J. C. T. Guzman, R. M. Sanchez (2001) « *Interactions of Chromium with microorganisms and plants* », FEMS Microbiology Reviews, 25,335-347.

S. Chatterjee, M. Adhya, A. K. Guba, B. P. Chatterjee (2005) « *Chitosan from *Mucor rouxii* : production and physio-chemical characterization* », Process Biochemistry, 40, 395-400.

L. Chen, Y. Du, X. Zeng (2003) « *Relationships between the molecular structure and moisture absorption and moisture retention abilities of carboxymethyl chitosan : Effect of degree of deacetylation and carboxymethylation* », Carbohydrate research, 338, 333-340.

B. K. Choi, K. Y. Kim, Y. J. Yoo, S. J. Oh, J. H. Choi, C.Y.Kim (2001) « *In vitro antimicrobial activity of chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans** », International Journal of Antimicrobial Agent, 18, 553-557.

Y. C. Chung, H. L. Wang, Y. M. Chen, S. L. Li (2003) « *Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens* », Bioresource Technology, 88, 179-184.

C. A. Clausen (2000) « *CCA removal from treated wood using a dual remediation process* », Waste Management Research, 18, 485-488.

V. Coma, (2001). « *Les emballages actifs, produits d'avenir en agro-alimentaire* » Les dossiers techniques du Pôle aquitain Agro-alimentaire et Nutrition, N°3, Juillet

V. Coma, A. Deschamps, A. M. Gros (2003) « *Bioactive packaging materials from edible chitosan polymer antimicrobial activity assessment on dairy related contaminants* », Journal of Food Science, 68(9)2788-2792.

G. V. De la Cruz, J. A. Torres, M. O. Martin-Polo (2001) « *Temperature effect on the moisture sorption isotherms for methylcellulose and ethylcellulose films* », Journal of Food Engineering, 48,91-94.

C. B. Mc Crystal , J. L. Ford, A. R. R. Siahboomi (1999) « *Water distribution studies within cellulose ethers using differential scanning calorimetry : Effect of polymer substitution and addition* », Journal of pharmaceutical Science, 88(8), 797-801.

F. Debeaufort, J. Q. Gallo, B. Delporte , A.Voiley (2000) « *Lipid hydrophobicity and physical state effects properties of bilayer films* », Journal of Membrane Science, 4679, 1-8.

F. Debeaufort, A. Voiley (1995) « *Effect of surfactants and drying rate on barrier properties of emulsified edible films* », International Journal of Food Science and Technology, 30,183-190.

R. F. H.Dekker (1985) « *Biodegradation of the hemicelluloses* », Biosynthesis and Biodegradation of wood components, Chapitre 18.

F. Devlieghere, L. Vermeiren, M. Jacobs, J. Debevere (2000) « *The effectiveness of Hexa methylene tetramine incorporated plastic for the active packaging of food* », Packaging Technology and Science, 13, 117-121.

F. Devlieghere, A. Vermeulen, J. Debevere (2004) « *Chitosan : antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables* », Food Microbiology, 21, 703-714.

M. L. Duarte, M. C. Ferreira, M. R. Marvao, J. Rocha (2002) « *An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy* », International Journal of Biological Macromolecules, 31, 1-8.

M. Eikenes, G. Alfredsen, B. E. Christensen, H. Militz, H. Solheim (2005) « *Comparison of chitosans with different molecular weight as possible wood preservatives* », Journal of Wood Science, 51, 387-394.

M. Eikenes, G. Alfredsen, E. Larnoy, H. Militz, B. Kreber, C. Chittenden (2005) « *Chitosan for wood protection : state of the art* », 36th Annual Meeting of The International Research Group on Wood Protection.

K. F. El-tahlawy, M. A. El-bendary, A. G. Elhendawy, S. M. Hudson (2005) « *The antimicrobial activity of cotton fabrics treated with different crosslinking agents and chitosan* », Carbohydrate polymers, 60, 421-430.

K. E. Eriksson, T. M. Wood (1985) « *Biodegradation of Cellulose* » Biosynthesis and Biodegradation of wood components, Chapitre 17.

Fernandez Freire, V. Labrador, J. M. P. Martin, M. J. Hazen (2005) « *Cytotoxic effects in mammalian vero cells exposed to pentachlorophenol* », Toxicology, 210, 37-44.

S. Fimbeau, S. Grelier, A. Copinet et V. Coma (2006) « *Novel Biodegradable films from chitosan and poly(lactic acid) with antifungal properties against mycotoxinogen strains* », Carbohydrate Polymers, In press.

T. A. Gasiewicz (1997) « *Exposure to dioxin and dioxin-like compounds as a potential factor in developmental disabilities* », Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews, 3, 230-238.

N. Gontard (2000) « *Les emballages actifs* », Edition TEC & DOC.

R. J. A. Gosselink, A. M. A. Krosse, J. C. V. Der Putten, J. C. V. Der Kolk, B. D. K. Engels, J. E. G. Van Dam (2004) « *Wood preservation by low temperature carbonisation* », Industrial Crops and Products, 19, 3-12.

I. M. Helander, E. L. N. Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, S. Roller (2001) « *Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram negative bacteria* », International Journal of Food Microbiology, 71, 235-244.

J. A. Hingston, C. D. Collins, R. J. Murphy, J. N. Lester (2001) « *Leaching of Chromated Copper Arsenate wood preservatives : a review* », Environmental Pollution, 111, 53-66.

J. Hjartstam, T. Hjertberg (1999) « *Effect of hydroxyl group content in ethyl cellulose on permeability in free film and coated membrane* », Journal of Applied Polymer Science, 72, 529-535.

M. Jansson-Charrier, I. Saucedo, E. Guibal, P.L.Cloirec (1995) « *Approach of uranium sorption mechanisms on chitosan and glutamate glucan by IR and ¹³C NMR analysis* », Reactive & Functional Polymers, 27, 209-221.

Z. Jia, D. Shen, X. Xu (2001) « *Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan* », Carbohydrate research, 333, 1-6.

X. Jiang, L. Chen, W. Zhong (2003) « *A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan* », Carbohydrate Polymers, 54, 457-463.

Y. Jiang, J. Li, W. Jiang (2005) « *Effects of chitosan coating on self life cold stored litchi fruit at ambient temperature* », LWT, 38, 757-761.

S. N. Kartal (2003) « *Removal of copper, Chromium and Arsenic from CCA-C treated wood by EDTA extraction* », Waste Management, 23, 537-546.

S. A. Katz et H. Salem (2005) « *Chemistry and toxicology of building timbers pressure treated with Chromated Copper Arsenate : a review* », Journal of Applied Toxicology, 25, 1-7.

T. Kean, S. Roth, M. Thanou (2005) « *Trimethylated chitosans as non viral gene delivery vectors : cytotoxicity and transfection efficiency* », Journal of Controlled release, 103, 643-653.

J. J. Kestler, O. Fennema (1989) « *An edible film of lipids and cellulose ethers : barrier properties to moisture vapor transmission and structural evaluation* », Journal of Food Science, 54, 1383-1389.

Y. M. kim, D. S. An, H. J. Park, J. M. Park, D. S. Lee (2002) « *Properties of nisin incorporated polymer coating as antimicrobial packaging materials* », Packaging Technology and Science, 15, 247-254.

C. H. Kim, J. W. Choi, H. J. Chun, K. S. Choi (1997) « *Synthesis of chitosan derivatives with quaternary ammonium salt and their antibacterial activity* », Polymer Bulletin, 38, 387-393.

S. J. Kim, Z. Ustunol (2001) « *Solubility and moisture sorption isotherms of whey protein based edible films as influenced by lipid and plasticizer incorporation* », Journal of Agricultural Food and Chemistry, 49, 4391-4399.

T. Kobayshi, I. Furukama (1995) « *Wood preseving effectiveness of chitosan metal salts against wood decaying fungi* », Journal of Antibacterial and antifungal Agents, 23, 343-348.

P. Laflamme, N. Benhamou, G. Bussièrès, M. Dessureault (1999) « *Differentiel effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries* », Canadian Journal of Botany, 77, 1460-1468.

E. Larnoy, M. Eikenes, H. Militz (2005) « *Uptake of chitosan based impregnation solution with varying viscosities in four different European wood species* », Holz als Roh und Werkstoff, 1-7.

M. Lavertu, Z. Xia, A. N. Serreqi, M. Berrada, A. Rodrigues, D. Wang, M. D. Buschmann, A. Gupta (2003) « *A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan* », Journal of Pharmaceutics and Biomedical Analysis, 32, 1149-1158.

M. Lebkowska, M. Z. Radziwill, A. R. Narozniak, S. Kobiela (2003) « *Toxicity assessment of wood preservatives* », Environment International, 28, 801-802.

C. H. Lee, D. S. An, S. C. Lee, H. J. Park, D. S. Lee (2004) « *A coating for use as an antimicrobial and antioxidative packaging material incorporating nisin and α -tocopherol* », Journal of Food Engineering, 62, 323-329.

C. H. Lee, D. S. An, H. J. Park, D. S. Lee (2003) « *Wide spectrum antimicrobial packaging materials incorporating nisin and chitosan in coating* », Packaging Technology and Science, 16, 99-106.

J. K. Lee, H. S. Lim, J. H. Kim (2002) « *Cytotoxic activity of aminoderivatized cationic chitosan derivatives* », Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 12, 2949-2951.

A. Leonowicz, A. Matuszewska, J. Luterek, D. Ziegenhagen, M. W. Wasilewska, N. S. Cho, M. Hofrichter, J. Rogalski (1999) « *Biodegradation of lignin by white rot fungi* » Fungal Genetics and Biology, 27, 175-185.

S. H. Lim, S. H. Hudson (2004) « *Synthesis and antimicrobial activity of a water soluble chitosan derivative with a fiber reactive group* », Carbohydrate research, 339, 313-319.

X. F. Liu, Y. L. Guan, D. Z. Yang, Z. Li, K. D. Yao (2001) « *Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan* », Journal of Applied Polymer Science, 79, 1324-1335.

A. Mabicka, S. Dumarçay, N. Rouhier, M. Linder, J.P. Jacquot, P. Gérardin, E. Gelhaye (2005) « *Synergistic wood preservatives involving EDTA, irganox 1076 and 2-hydroxypyridine-N-oxide* » International Biodeterioration and Biodegradation, 55, 203-211.

A. D. Martino, M. Sittinger, M.V. Risbud (2005) « *Chitosan : a versatile biopolymer for orthopaedic tissue engineering* », Biomaterials, 26, 5983-5990.

M. Mathlouthi (1996) « *Emballage et conservation des produits alimentaires* », Polytechnica.

S. Matsushashi, T. Kume (1997) « *Enhancement of antimicrobial activity of chitosan by irradiation* », Journal of Science Food Agricultural, 73, 237-241.

P. Methacanon, M. Prasitsilp, T. Pothsree, J. Pattaraarchachai (2003) « *Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution* », Carbohydrate Polymers, 52, 119-123.

Mkandawire, Y. V .Lyubun, P. V .Kosterin, E. G. Dudel (2004) « *Toxicity of Arsenic species to (*Lemna gibba L*) and the influence of phosphate on arsenic bioavailability* », www.interscience.wiley.com

H. Moller, S. Grelier, P. Pardon, V. Coma (2004) « *Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan –HPMC based films* », Journal of Agricultural Food and Chemistry, 52, 6585-6591.

J. Muir, G. Eduljee (1999) « *PCP in the freshwater and marine environment of the European Union* », The Science of the Total Environment, 236, 41-56.

R. A. A.Muzzareli, C. Muzzarelli, R. Tarsi, M. Miliani, F. Gabbanelli, M. Cartolari (2001) « *Fungistatic Activity of modified chitosans against *Saprolegnia parasitica** », Biomacromolecules, 2, 165-169.

F. S. Nakayama, S. H. Vinyard, P. Chow, D. S. Bajwa, J. A. Youngquist, J. H. Muehl, A. M. Krzysik (2001) « *Guayule as wood preservative* », Industrial Crops and Products, 14, 105-111.

P. V. Nielsen, R. Rios (2000) « *Inhibition of fungal growth on bread by volatile comonents from spices and herbs, and the possible application in active packaging with special emphasis on mustard essential oil* », International Journal of Food Microbiology, 60, 219-229.

H. K. No, S. H. Lee, N. Y. Park, S. P. Meyers (2003) « *Comparison of physicochemical binding and antibacterial properties of chitosans prepared without and with deproteinization process* », Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 7659-7663.

H. K. No, N. Y. Park, S. H. Lee, S. P. Meyers (2002) « *Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weigh* », International Journal of Food Microbiology, 74, 65-72.

B. Ouattara, R. E. Simard, G. Piette, A. Bégin, R. A. Holley (2000) « *Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan* », International Journal of Food Microbiology, 62, 139-148.

S. Palanti, D. Susco (2004) « *A new wood Preservative based on heated oil treatment combined with triazole fungicides developed for above ground conditions* », International Biodeterioration and Biodegradation, 54,337-342.

Pandey, C. P. Sharma (2003) « *Chromium interference in Iron nutrition and water relation of cabbage* », Environmental and Experimental Botany, 49,195-200.

Y. Peng, B. Han, W. Liu, X. Xu (2005) « *Preparation and antimicrobial activity of hydroxypropyl chitosan* », Carbohydrate research, 340, 1846-1851.

X. Peng, L. Zhang (2005) « *Surface fabrication of hollow microspheres from N-methylated chitosan cross linked with gultaraldehyde* », Langmuir, 21, 1091-1095.

A. Polnok, G. Borchard, J.C. Verhoef, N. Sarisuta, H.E. Junginger (2004) « *Influence of methylation process on the quaternization of N-trimethyl chitosan chloride* », European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 57, 77-83.

C. Qin, H. Li, Q. Xiao, Y. Liu, J. Zhu, Y. Du (2005) « *Water solubility of chitosan and its antimicrobial activity* », Carbohydrates Polymers, 63, 367-374.

S. Raisuddin et A. N. Jha (2004) « *Relative sensitivity of fish and mammalian cells to Sodium Arsenate and Arsenite as determined by alkaline single cell gel electrophoresis and cytokinesis block micronucleus assay* », Environmental and Molecular Mutagenesis, 44, 83-89.

S. Richardson, T. Andersson, G. Brinkmalm, B. Wittegren (2003) « *Analytical approaches to improved characterization of substitution in hydroxypropylcellulose* », Analytical Chemistry, 75, 6077-6083.

S. Roller, N. Covill (1999) « *The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice* », International Journal of Food Microbiology, 47, 67-77.

V. Rungsardthong, N. Wongvuttanakul, N. Kongpien, P. Chotiwaranon (2005) « *Application of Fungal chitosan for clarification of apple juice* » Process Biochemistry.

T. P. Schultz, D. D. Nicholas (2000) « *Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of extractives* », Phytochemistry, 54, 47-52.

Issam Sebti (2002) « *Bioemballage actif incorporant la nisine, diffusion de cette bactériocine en gel d'agarose* », Thèse de l'université de bordeaux 1.

I. Sebti, J. D. Broughton, V. Coma (2003) « *Physicochemical properties and bioactivity of nisin containing cross linked hydroxypropylmethyl cellulose films* », Journal of Agricultural Food and Chemistry, 51, 6468-6474.

I. Sebti, F. H. Pichavant, V. Coma (2002) « *Edible bioactive fatty acid cellulosic derivative composites used in food packaging applications* », Journal of Agricultural and Food Science, 50, 4290-4294.

S. Senel, S.J. McClure (2004) « *Potential applications of chitosan in veterinary medicine* », Advanced Drug Delivery Reviews, 56, 1467-1480.

B. L. Shah, L. M. Matuana (2005) « *Novel coupling agents for PVC/wood flour composites* », Journal of Vinyl and Additive Technology, 160-165.

Y. Shin, D. I. Yoo, J. Jang (2001) « *Molecular weight effect on antimicrobial activity of chitosan treated cotton fabrics* », Journal of Applied Polymer Science, 80, 2495-2501.

D. Snyman, J. H. Hamman, J. S. Kotze, J. E. Rollings, A. F. Kotzé (2002) « *The relationship between the absolute molecular weight and degree of quaternisation of N-trimethyl chitosan chloride* », Carbohydrate polymers, 50, 145-150.

N. F. F. Soares, D.M.Rutishauser, N.Melo, R.S.Cruz, N.J.Andrade (2002) « *Inhibition of microbial growth in bread through active packaging* », Packaging Technology and Science, 15, 129-132.

H. M. Solo-Gabriele, T.G.Townsend, B.Messick, V.Calitu (2002) « *Characteristics of Chromated Copper Arsenite treated wood ash* », Journal of Hazardous Materials, B89, 213-232

P. Soulounganga (2002) « *Étude de nouveaux traitements de protection du bois à base de polyglycerols* » Thèse, Université de Nancy1.

S. C. Tan, E. Khor, T. K. Tan, S. M. Wong (1998) « *The degree of deacetylation of chitosan : advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination* », Talanta, 45, 713-719.

S. C. Tan, T. K. Tan, S. M. Wong, E. Khor (1996) « *The chitosan yield of zygomycetes a their optimum harvesting time* », Carbohydrate Polymers, 30,239-242.

K. N. Thuram, F. Sahbaz, A.Guner (2001) « *A spectrophotometric study of hydrogn bonding in methyl cellulose based edible films plasticized by polyethylene glycol* », Journal of Food Science, 66(1), 59-62.

K. M. Torr, C. Chittenden, R. A. Franich, B. Kreber (2005) « *Advances in understanding bioactivity of chitosan and chitosan oligomers against selected wood inhibition fungi* », Holzforschung, 59, 559-567.

M. Tuomela, M. Vikman, A. Hatakka, M. Itavaara (2000) « *Biodegradation of lignin in a compost environment : a review* », Bioresource Technology, 72, 169-183.

J. Vartiainen, E. Skytta, J. Enqvist, R. Ahvenainen (2003) « *Properties of antimicrobial plastics containing traditional food preservatives* », Packaging Technology and Science, 16, 223-229.

K. V. D. Velde, P. Kiekens (2004) « *Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutrylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state ¹³C NMR* », Carbohydrate polymers, 58, 409-416.

K. Voda, B. Boh, M. Vrtacnik, F. Pohleven (2003) « *Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and brown-rot *Coniophora puteana** », International Biodeterioration and Biodegradation, 51, 51-59.

X. Wang, Y. Du, H. Liu (2004) « *Preparation and characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex* », Carbohydrate polymers, 56, 21-26.

Y. B. Wu, S. H. Yu, F. L. Mi, C. W. Wu, S. S. Shyu, C. K. Peng, A. C. Chao (2004) « *Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitosan/cellulose blends* », Carbohydrate Polymers, 57, 435-440.

W. Xie, P. Xu, W. Wang, Q. Liu (2002) « *Preparation and antibacterial activity of a water soluble chitosan derivative* », Carbohydrate polymers, 50, 35-40.

Z. T. Xiong, H. Wang (2004) « *Copper toxicity and bioaccumulation in chinese cabbage (Brassica pekinensis Rupr)* », www.interscience.wiley.com

G. Xu, B. Goodell (2001) « *Mechanisms of wood degradation by brown-rot fungi : Chelator mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose* », Journal of Biotechnology, 87, 43-57.

T. S. Yang, C. C. Chou, C. F. Li (2005) « *Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives* », International Journal of Food Microbiology, 97, 237-245.

L. Yang, A. T. Paulson (2000) « *Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film* », Food Research international, 33, 571-578.

W. Ye, M. F. Leung, J. Xin, T. L. Kwong, D. K. L. Lee, P. Li (2005) « *Novel core shell particles with poly(n-butyl acrylate) cores and chitosan shells as an antibacterial coating for textiles* », Polymer, 46, 10538-10543.

H. D. Youn, Y. C. Hah, S. O. Kang (1995) « *Role of Laccase in lignin degradation by white rot fungi* », FEMS Microbiology Letters, 132, 183-188.

Y. Zhang, C. Xue, Y. Xue, R. Gao, X. Zhang (2005) « *Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction* », Carbohydrate Research, 340, 1914-1917.

Y. J. Zhou, P. Luner, P. Caluwe (1995) « *Mechanism of crosslinking of paper with polyfunctional carboxylic acids* », Journal of Applied Polymers Science, 58, 1523-1534.

B. Z. Zhu, S. Shechtman, M. Chevion (2001) « *Synergistic cytotoxicity between pentachlorophenol and copper in bacterial model* », Chemosphere, 45, 463-470.

RESUMÉ.

Notre objectif consiste, dans un premier temps, à synthétiser des biocides en valorisant des ressources renouvelables, comme le chitosane. Ce biopolymère est obtenu après déacétylation de la chitine, constituant de la paroi des crustacés et des insectes.

Le biocide ainsi obtenu sera utilisé dans deux applications :

- 1. Application à la préservation du bois.*
- 2. Application à la préservation des aliments par l'intermédiaire de bioemballages antibactériens.*

Le fil conducteur qui lie ces deux parties qui apparaissent à première vue très éloignées l'une de l'autre est le respect de l'environnement et la préservation de la santé publique.

Ainsi, pour lutter contre ces dégradations biologiques, que le bois subit, il est traité par des produits chimiques, comme la créosote, le pentachlorophenol (PCP) et les sels métalliques. Cependant la carence des produits de préservation actuels vis-à-vis de l'environnement et leur nocivité pour les organismes non ciblés a conduit à leur interdiction totale ou partielle.

*D'autre part, la croissance microbienne à la surface de produits alimentaires est une cause majeure d'altération des aliments et le développement de souches pathogènes comme *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* posent aujourd'hui encore des problèmes de santé publique. De plus, les matériaux d'emballages à base de macromolécules synthétiques utilisés jusqu'à maintenant posent un problème de non renouvellement des ressources associé à un impact sur l'environnement négatif.*

MOTS CLES: *Chitosane, Modification chimique, Préservation du bois, Préservation des aliments.*

ABSTRACT

Chitosan is a copolymer of β -1,4 linked glucosamine unit and N-acetyl glucosamine unit obtained after partial chitin deacetylation. Chitosan has been proved to be non toxic, biodegradable, biocompatible and exhibited antimicrobial activity.

Antimicrobial activity is mainly due to the electrostatic interaction between positively charged amino group with negatively charged microbial cell membranes. This interaction compromises the membrane's integrity and causes leakage of intracellular material, leading to bacterial cell death

To improve the antimicrobial activity and physicochemical properties of chitosan, a chemical modification of biopolymer was performed to produce quaternary ammonium. Quaternization of N-alkyl chitosan derivatives were carried out using alkyl iodide to produce water soluble cationic polyelectrolytes. The chemically modification was characterized by NMR spectroscopy and the quaternization degree was determined by titration of iodide ion.

The antifungic activity of chitosan and quaternized chitosan against brown root fungus and white root fungus was evaluated.

*The antibacterial activity of quaternized chitosan against *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* and *Salmonella typhimurium* was compared to the antibacterial activity of chitosan in liquid medium and on solid medium. The antibacterial activity was evaluated by the numeration method.*

KEYWORDS : *Chitosan, quaternized alkyl chitosans, antifungic activity, antibacterial activity.*