



**HAL**  
open science

# Développement de composites nanostructurés à base de biopolyesters et de nanoparticules de chitosane générées par des procédés assistés par CO<sub>2</sub> supercritique

Nibal Hijazi

► **To cite this version:**

Nibal Hijazi. Développement de composites nanostructurés à base de biopolyesters et de nanoparticules de chitosane générées par des procédés assistés par CO<sub>2</sub> supercritique. Génie des procédés. Ecole des Mines d'Albi-Carmaux, 2014. Français. NNT : 2014EMAC0016 . tel-01165171

**HAL Id: tel-01165171**

**<https://theses.hal.science/tel-01165171>**

Submitted on 18 Jun 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

École Nationale Supérieure des Mines d'Albi-Carmaux conjointement avec l'INP Toulouse

---

**Présentée et soutenue par :**

**Nibal HIJAZI**

le jeudi 11 décembre 2014

**Titre :**

Développement de composites nanostructurés à base de biopolyesters et de nanoparticules de chitosane générées par des procédés assistés par CO<sub>2</sub> supercritique

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED MEGEP : Génie des procédés et de l'Environnement

**Unité de recherche :**

Centre RAPSODEE, CNRS - UMR 5302, Mines Albi / Centre C2MA, Mines Alès

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Jacques FAGES  
Jean-Charles BENEZET

**Jury :**

Violette DUCRUET, Ingénieur de Recherche, INRA AgroParisTech, Rapporteur  
Patrick LACROIX-DESMAZES, Dr. de Recherches CNRS, ENSCM - Montpellier, Rapporteur  
Anne BERGERET, Professeur, École des Mines d'Alès, Examineur  
Jean COUDANE, Professeur, Université de Montpellier 1, Président  
Jacques FAGES, Professeur, École des Mines d'Albi-Carmaux, Directeur  
Jean-Charles BENEZET, Maître de Recherche, École des Mines d'Alès, Co-directeur  
Martial SAUCEAU, Maître assistant, École des Mines d'Albi-Carmaux, Examineur  
Nicolas LE MOIGNE, Maître assistant, École des Mines d'Alès, Examineur



# **REMERCIEMENTS**

Ces travaux de thèse ont été codirigés par le Pr. Jacques Fages (Mines Albi-CNRS) et le Dr. Jean-Charles Benezet (Mines Alès). La phase de génération de nanoparticules de polymères biosourcés en utilisant le CO<sub>2</sub> supercritique a été réalisée au sein de l'équipe des fluides supercritiques à RAPSODEE où l'encadrement a été assuré par le Dr. Elisabeth Rodier, Dr. Martial Sauceau et Dr. Jean-Jacques Letourneau, enseignants-chercheurs à Mines Albi ; l'élaboration et la caractérisation des biocomposites nanostructurés a eu lieu au centre C2MA sous l'encadrement du Dr. Nicolas Le Moigne, enseignant-chercheur à Mines Alès.

En premier lieu, je tiens à remercier très vivement mes codirecteurs de thèse et toute l'équipe d'encadrement de m'avoir fait confiance pour accomplir ce travail et de leur soutien. En particulier, je sais gré à **Elisabeth Rodier**, qui nous a malheureusement quittés récemment, de la confiance qu'elle m'avait toujours témoignée, de ses qualités humaines, de son professionnalisme, de sa présence continue et de sa bonne humeur ; Elisabeth, tu vas beaucoup nous manquer.

En second lieu, je remercie chaleureusement Madame Violette Ducruet, ingénieur de recherches à l'INRA, et Monsieur Patrick Lacroix-Desmazes, directeur de recherches CNRS à l'ENSCM, de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail. Mes remerciements s'adressent également à Madame Anne Bergeret, Professeur au C2MA de l'école des mines d'Alès, et Monsieur Jean Coudane, Professeur à l'IBMM, pour avoir accepté d'être examinateurs de mes travaux de thèse.

J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur Eric Guibal, docteur et chercheur au C2MA et Monsieur Thierry Vincent, technicien au C2MA pour leur contribution à mes travaux. Les échanges scientifiques que nous avons eus se sont révélés fructueux.

Je souhaite exprimer mes remerciements à l'ensemble des permanents des deux centres de recherche RAPSODEE et C2MA, pour leur aide lors de l'utilisation des différentes techniques expérimentales et procédures administratives, et surtout pour leur gentillesse. Un grand merci à Bruno Boyer, ancien technicien de l'équipe supercritique de RAPSODEE, pour sa présence et sa réactivité permanente.

Mes remerciements vont aussi aux collègues doctorants, post-doctorants et stagiaires que j'ai pu côtoyer pendant ma thèse avec qui j'ai pu partager d'excellents moments, tant au sein du laboratoire qu'au cours des différents congrès auxquels nous avons participé ou encore en dehors du travail.

Une petite pensée particulière à Sarah Camelo, Xiaojuan Zhao et Fredj Kaouach, mes collègues de bureau à RAPSODEE ; ce bureau qui a réuni quatre doctorants de différents continents, donnant lieu à des moments de folie exotiques et inoubliables. De la même façon, je m'adresse à mes collègues du couloir du C2MA : Charlotte Campana, Lata Soccalingame, Laurent Puech, Violette Bourg et en particulier, l'Espagnol, Jose Acera ; je vous remercie tous de m'avoir accueilli et intégré parmi vous et d'avoir rendu mon déplacement à Alès peu difficile. Je n'oublie pas Angélique et Rémi : grâce à vous, j'ai pu partager des moments sympathiques à Alès, je me suis motivée pour apprendre la danse et à assister aux soirées dansantes, je suis devenue accro aux jeux vidéo (ça n'a pas duré longtemps heureusement !!!). Bref, vous m'avez fait oublier ma séparation d'Albi.

Mes COUPINES de l'INSA, je pense à vous aussi!! Lucile et Clotilde, merci à vous et à vos familles pour les nombreux accueils chaleureux pendant mon parcours loin de ma famille; vous avez rendu mon séjour tellement plus facile. Vous êtes ma deuxième famille ! Lucie Chaudy, j'ai apprécié chaque moment passé avec toi, nos discussions, les soirées « fille », la MAIRIE et surtout ... le SKI (sans commentaire sur ce dernier point).

Enfin, et pour conclure, je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien tout au long de ce travail de thèse ; un maxi bisou va particulièrement à Bilal, mon complice depuis toujours qui doit sûrement se vanter que je sois arrivée là grâce à lui, ce qui n'est pas complètement faux. Je souhaite tout spécialement exprimer ma profonde reconnaissance à mes parents qui ont toujours été là pour moi pendant toutes ces longues années d'études, qui ont partagé les moments heureux mais aussi difficiles, qui ont supporté tous mes changements d'humeur et caprices et qui m'ont encouragé sans relâche, malgré l'éloignement.

\*\*\* مع جزيل الشكر \*\*\*



... إلى أمي

... إلى أبي

... إلى إخوتي





# **TABLE DES MATIERES**

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I. Contexte du projet et etat de l'art.....</b>	<b>5</b>
I. GENERALITES SUR LES BIOPLASTIQUES .....	6
A. Définition .....	6
B. Production et utilisations industrielles.....	7
II. BIOCOSITES : LES CONSTITUANTS .....	10
A. Les charges.....	11
1. Les protéines.....	11
2. Les polysaccharides.....	12
a. Le chitosane : origine et obtention .....	14
b. Le chitosane : structure et propriétés.....	14
i. Paramètres moléculaires.....	15
ii. Propriétés physico-chimiques et biologiques.....	16
B. Les matrices .....	22
1. Le poly (acide lactique) – PLA.....	22
a. Origine et obtention .....	22
b. Propriétés .....	23
i. Structure cristalline .....	23
ii. Propriétés mécaniques.....	24
iii. Propriétés thermiques.....	25
2. Le Poly(Hydroxybutyrate-co-hydroxyvalérate) – PHB-HV .....	27
a. Origine et obtention .....	27
b. Propriétés .....	29
i. Structure cristalline .....	29
ii. Propriétés mécaniques.....	30
iii. Propriétés thermiques.....	32
III. BIOCOSITES : LES PROCEDES DE GENERATION .....	33
A. Procédés de génération des particules de chitosane .....	33
1. Particules obtenues par méthodes traditionnelles .....	34
a. Réticulation en émulsion ( <i>emulsion cross-linking</i> ).....	34
b. Méthode de gélification ionique ( <i>ionic gelation</i> ).....	35
c. Coacervation/précipitation.....	36
d. Atomisation- séchage ( <i>spray-drying</i> ) .....	36
e. Emulsion-coalescence.....	37
f. Méthode de micelles inverses .....	38
g. Méthode de tamisage.....	39
2. Particules obtenues par des procédés assistés par le CO <sub>2</sub> supercritique .....	40
a. Généralités sur les fluides supercritiques .....	40
i. Définition.....	40
ii. Propriétés .....	41

TABLE DES MATIERES

iii.	Principaux procédés assistés par CO <sub>2</sub> -sc.....	42
b.	Procédés assistés par CO <sub>2</sub> -sc pour la génération des particules de chitosane.....	42
i.	Atomisation assistée par CO <sub>2</sub> supercritique (SAA) .....	43
ii.	Atomisation assistée par CO <sub>2</sub> -sc en introduisant un mélangeur par cavitation hydrodynamique (SAA-HCM) .....	44
B.	<i>Méthodes d'élaboration des composites biopolyester/chitosane</i> .....	45
1.	Par voie en solution .....	46
i.	Solution- cast.....	46
ii.	Adsorption et greffage .....	46
iii.	Précipitation .....	47
2.	Par voie fondue (hot-melt extrusion).....	47
IV.	LES COMPOSITES : PLA/CHITOSANE ET PHB/CHITOSANE.....	48
A.	<i>PLA et chitosane</i> .....	48
1.	Sphères composites .....	48
2.	Fibres composites .....	49
3.	Films composites.....	50
B.	<i>PHB/chitosane</i> .....	53
1.	Films composites.....	54
2.	Fibres composites .....	54
V.	CONCLUSIONS SUR L'ETAT DE L'ART .....	56
<b>CHAPITRE II.    MATERIELS, MATERIAUX ET METHODES.....</b>		<b>59</b>
I.	MATERIAUX.....	60
A.	<i>Les matrices</i> .....	60
1.	Le Poly (acide lactique) – PLA.....	60
2.	Le poly (hydroxy butyrate-co-valérate) – PHBV .....	61
B.	<i>Les charges</i> .....	61
1.	Chitosane .....	61
II.	PROCEDES ET PROTOCOLES OPERATOIRES .....	62
A.	<i>Préparation des solutions</i> .....	62
1.	Solutions de chitosane .....	62
2.	Suspensions de chitosane .....	63
3.	Solutions alcalines.....	63
4.	Test antibactérien .....	63
B.	<i>Procédés de génération de particules</i> .....	64
1.	Par effet Anti-solvant supercritique (SAS).....	64
a.	Montage expérimental .....	64
b.	Protocole opératoire .....	65
2.	Atomisation assistée par CO <sub>2</sub> supercritique (SCASA) .....	65
a.	Montage expérimental .....	65
b.	Protocole opératoire .....	66
3.	Nébulisation/précipitation.....	67

TABLE DES MATIERES

C.	<i>Extrusion-cast des films biocomposites</i> .....	68
III.	PROTOCOLES ANALYTIQUES ET CARACTERISATIONS DES PARTICULES ET DES FILMS BIOCOMPOSITES .....	69
A.	<i>Analyse de la morphologie et de la granulométrie des particules et des films biocomposites</i> .....	69
1.	Granulométrie et distribution de taille .....	69
a.	Granulométrie en voie sèche .....	69
b.	Granulométrie en voie liquide .....	69
2.	Aspect et dispersion des charges dans les matrices .....	70
B.	<i>Analyse macromoléculaire</i> .....	70
1.	Masse moléculaire viscosimétrique .....	70
2.	Masse moléculaire par chromatographie par perméation de gel .....	72
3.	Densité, viscosité et tension de surface .....	72
C.	<i>Analyse de la stabilité thermique et de la cristallisation</i> .....	73
1.	Thermogravimétrie (ATG) .....	73
2.	Calorimétrie différentielle à balayage (DSC) .....	73
a.	Etude en DSC classique : anisotherme linéaire .....	74
b.	Etude en DSC modulée en température et step-scan .....	75
i.	StepScan .....	75
ii.	DSC modulée en température (TMDSC) .....	76
c.	Etude cinétique isothermique .....	77
D.	<i>Analyse structurale</i> .....	78
1.	Cristallinité par diffractométrie de rayons X (DRX) .....	78
2.	Degré d'acétylation (DA) .....	79
a.	Par résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	79
b.	Par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) .....	79
E.	<i>Analyse des propriétés viscoélastiques et thermomécaniques</i> .....	80
1.	Par analyse mécanique dynamique (DMA) .....	80
<b>CHAPITRE III.    GENERATION DE NANOPARTICULES DE CHITOSANE PAR DES PROCÉDÉS ASSISTÉS PAR CO<sub>2</sub></b>		
<b>SUPERCRITIQUE</b> .....		<b>83</b>
I.	ETUDE DES CONDITIONS DE PROCÉDÉS DE GENERATION DE PARTICULES DE CHITOSANE .....	84
A.	<i>Procédé par effet anti-solvant supercritique – SAS</i> .....	84
1.	Principe de l'effet anti-solvant appliqué au cas du chitosane .....	84
2.	Essais préliminaires .....	84
3.	Optimisation du procédé SAS pour la génération de particules de chitosane .....	86
a.	Optimisation du ratio acide acétique/chitosane .....	86
b.	Renforcement de la miscibilité entre la solution de chitosane et le CO <sub>2</sub> -sc par ajout d'éthanol .....	86
c.	Nouvelle configuration : SAS en mode semi-continu .....	86
d.	Neutralisation de l'acidité résiduelle par une solution basique dans l'autoclave de précipitation .....	88
4.	Résultats obtenus suite aux modifications apportées au procédé SAS .....	88
a.	Effet de la solution de récupération sur les particules de chitosane générées .....	88
b.	Effet de la concentration du chitosane sur les particules générées .....	93

TABLE DES MATIERES

c.	Comparaison des résultats aux résultats obtenus dans la littérature.....	93
B.	<i>Procédé d'atomisation et de solubilisation assistées par CO<sub>2</sub>-sc (SCASA)</i> .....	94
1.	Principe du procédé : une acidification due à la dissolution du CO <sub>2</sub> dans l'eau.....	94
2.	Optimisation des conditions du procédé .....	94
II.	INFLUENCE DES PROCEDES DE GENERATION SUR LES PROPRIETES DES PARTICULES DE CHITOSANE.....	97
A.	<i>La morphologie et la granulométrie des particules de chitosane</i> .....	97
B.	<i>Structure cristalline des particules par diffraction des rayons X</i> .....	101
C.	<i>Mesure du degré d'acétylation par spectroscopie infrarouge</i> .....	103
D.	<i>Stabilité thermique des particules par analyse thermogravimétrique</i> .....	105
III.	CONCLUSIONS SUR LA GENERATION DES NANOPARTICULES DE CHITOSANE PAR LES PROCEDES SAS ET SCASA .....	108
<b>CHAPITRE IV. ELABORATION ET PROPRIETES DES FILMS BIOCOMPOSITES PLA/CHITOSANE ET PHBV/CHITOSANE .</b>		
.....		<b>111</b>
I.	ETUDE DES PROPRIETES MORPHOLOGIQUES ET MICROSTRUCTURELLES DES MATERIAUX A BASE DE PLA, DE PHBV ET LEURS COMPOSITES .....	112
A.	<i>Evaluation de la dispersion des particules de chitosane dans les films de PLA et PHBV</i> .....	112
B.	<i>Etude de la cristallisation du PLA, du PHBV et de leurs composites</i> .....	116
1.	Effet de la mise en œuvre et de la présence des particules de chitosane sur la cristallisation anisotherme du PLA et du PHBV .....	116
a.	Cas des films composites à base de PLA .....	116
i.	Effet de la mise en œuvre : comparaison entre la première et la deuxième chauffe.....	118
ii.	Effet des particules de chitosane.....	119
b.	Cas des films composites à base de PHBV .....	125
i.	Effet de la mise en œuvre.....	125
ii.	Effet des particules de chitosane.....	126
2.	Effet des particules de chitosane sur la cinétique et le mode de cristallisation isotherme du PLA et du PHBV .....	128
a.	Cas des films composites à base de PLA .....	129
i.	Cinétique de cristallisation isotherme .....	129
ii.	Mode de cristallisation isotherme.....	131
b.	Cas des films composites à base de PHBV .....	134
i.	Cinétique de cristallisation isotherme .....	136
ii.	Mode de cristallisation isotherme.....	137
II.	ETUDE DES PROPRIETES FONCTIONNELLES DU PLA, DU PHBV ET DE LEURS COMPOSITES.....	141
A.	<i>Etude de la stabilité thermique du PLA, du PHBV et des composites</i> .....	141
1.	Cas des films composite à base de PLA .....	141
2.	Cas des films composite à base de PHBV .....	144
B.	<i>Analyse thermomécanique</i> .....	145
C.	<i>Propriétés antibactériennes</i> .....	151
III.	CONCLUSIONS SUR L'ELABORATION ET LES PROPRIETES DES FILMS COMPOSITES PLA/CHITOSANE ET PHBV/CHITOSANE.....	155
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>159</b>

*TABLE DES MATIERES*

<b>PRODUCTION SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>165</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>169</b>

## **ABBREVIATIONS**



## ABREVIATIONS

### NOMENCLATURE

$C$  ( $\text{kg}\cdot\text{m}^3$ ) : concentration

$k_a$  : constante d'acidité

DA (%) : degré d'acétylation

$K$  ( $\text{m}^3\cdot\text{kg}^{-1}$ ),  $a$  : constantes du système polymère/solvant

$K'$  : constante de Huggins

MM ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) : masse moléculaire

$M_v$  ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) : masse moléculaire viscosimétrique moyenne

$M_n$  ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) : masse moléculaire moyenne en nombre

$M_w$  ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) : masse moléculaire moyenne en poids

$D$  : indice de polydispersité

$m_t$  (g) : masse totale

$\eta$  ( $\text{mPa}\cdot\text{s}$ ) : viscosité dynamique du polymère

$\eta_0$  ( $\text{mPa}\cdot\text{s}$ ) : viscosité dynamique du solvant

$\eta_{\text{rel}}$  : viscosité relative

$\eta_{\text{sp}}$  : viscosité spécifique

$\text{pH}_i$  : pH initial

$\text{pH}_f$  : pH final

$\eta_{\text{int}}$  ( $\text{m}^3\cdot\text{kg}^{-1}$ ) : viscosité intrinsèque

$P_{Si}$  (MPa) : pression du séparateur  $i$

$P_A$  (MPa) : pression de l'autoclave

$Q_{\text{chit}}$  ( $\text{mg}\cdot\text{s}^{-1}$ ) : débit d'injection de la solution de chitosane

$Q_{\text{CO}_2}$  ( $\text{mg}\cdot\text{s}^{-1}$ ) : débit d'injection du  $\text{CO}_2$

$T_A$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) : température de l'autoclave

## ABBREVIATIONS

$T_c$  (°C) : température de cristallisation

$T_{cc}$  (°C) : température de cristallisation froide

$T_f$  (°C) : température de fusion

$T_g$  (°C) : température de transition vitreuse

$\Delta H_c$  (J·g<sup>-1</sup>) : enthalpie de cristallisation

$\Delta H_{cc}$  (J·g<sup>-1</sup>) : enthalpie de cristallisation froide

$\Delta H_f$  (J·g<sup>-1</sup>) : enthalpie de fusion

$\Delta H_f^0$  (J·g<sup>-1</sup>) : enthalpie de fusion théorique pour un polymère 100 % cristallin

$\chi_{c0}$  (%) : taux de cristallinité initial après extrusion

$\chi_{cf}$  (%) : taux de cristallinité final après cristallisation froide

$\Delta m$ (%) : perte de masse

$\omega$  (rad·s<sup>-1</sup>) : fréquence angulaire

$\varepsilon$  (%) : déformation

$G'$  (Pa) : module élastique

$G''$  (Pa) : module visqueux

$\tan \delta$  : facteur d'amortissement

$E$  (MPa) : module de Young

$2\theta$  (°) : angle de diffraction

## ACRONYMES

Ac Ac: acide acétique

Chit: chitosane

PAC : *Partially acetylated chitosan* = chitosane partiellement acétylé

PDC : *Partially deacetylated chitosan* = chitosane partiellement désacétylé

Mass : massique

## ABBREVIATIONS

Mol : molaire

EtOH : éthanol

FSC : fluide supercritique

CO<sub>2</sub>-sc : dioxyde de carbone supercritique

CaCO<sub>3</sub> : carbonate de calcium

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : carbonate de sodium

NaHCO<sub>3</sub> : bicarbonate de sodium/hydrogénocarbonate de sodium

HCl : acide chlorhydrique

NaOH : hydroxyde de sodium

KOH : hydroxyde de potassium

TPP : tripolyphosphate

FDA : Food and Drug Administration

RESS : Rapid Expansion of Supercritical Solutions

PGSS : Particles from Gas Saturated Solutions

SAS : Supercritical Antisolvent

SCASA : Supercritical CO<sub>2</sub> Assisted Solubilization and Atomization

SAA : Supercritical Assisted Atomization

SAA-HCM : Supercritical Assisted Atomization from Hydrodynamic Cavitation Mixer

PLA : poly (acide lactique)

P-D-LA : poly (*D*-acide lactique)

P-L-LA : poly (*L*-acide lactique)

P-DL-LA ou P-méso-LA : poly (*LD*-acide lactique) ou acide poly (*méso*-acide lactique)

ROP : polymérisation par ouverture du cycle

PHA : polyhydroxyalcanoate

## ABBREVIATIONS

P(3HB) ou PHB : poly (3-hydroxybutyrate)

P(3HB-3HV) ou P3HB-HV ou PHBV : poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate)

P(3HB-co-HHx) ou P3HB-HHX : poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)

P(3HO) ou PHO : poly (3-hydroxyoctanoate)

PC : polycarbonate

PE / bio- PE : polyéthylène / bio-polyéthylène

PEG : polyéthylène glycol

PET / bio-PET : poly (éthylène téréphtalate) / bio-poly (éthylène téréphtalate)

POE : poly (oxyéthylène)

PP : polypropylène

PS : polystyrène

PEBDL : polyéthylène basse densité linéaire

PVC : poly (chlorure de vinyle)

PCL : poly- $\epsilon$ -caprolactone

PBS : poly (butylène succinate)

PBAT : poly (butylène adipate-co-téréphtalate)

PBSA : poly ( butylène succinate-co-butylène adipate)

PLGA : poly (acide lactique-co-glycolique)

PBA : poly (butylène adipate)

PVA : poly (alcool vinylique)

PVAc : poly (acétate de vinyle)

*TPS : Thermoplastic starch = amidon thermoplastique*

## **TECHNIQUES DE CARACTERISATION**

ATG : analyse thermogravimétrique

## *ABBREVIATIONS*

DRX : diffraction de rayon X

DMA : analyse mécanique dynamique

DSC : calorimétrie différentielle à balayage

MEB : microscopie électronique à balayage

GPC / SEC : chromatographie d'exclusion stérique

RMN : résonance magnétique nucléaire

FT-IR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

COT : mesure du taux de carbone organique total

# **INTRODUCTION GENERALE**

À l'heure où les problèmes environnementaux et écologiques prennent une place considérable dans le monde, l'Homme est de plus en plus confronté à la nécessité du développement durable, notamment à l'échelle industrielle, afin de ne pas rater le virage vers une vie prospère à moyen et long termes.

Dans son application à l'ingénierie des matériaux polymères, le concept de durabilité impacte le choix des matières premières, la conception des procédés de mise en œuvre et la prise en compte de l'analyse du cycle de vie (ACV). Dans ce domaine et parmi les différentes démarches réalisées en vue de cet objectif, une approche consiste à utiliser des matériaux polymères biosourcés et à les structurer à l'échelle micrométrique ou nanométrique – par moussage ou par addition de charges micro/nanométriques, souvent inorganiques – dans le but d'améliorer certaines de leurs propriétés spécifiques pour répondre aux cahiers des charges techniques tout en respectant les contraintes environnementales. En effet, l'assemblage d'au moins deux matériaux permettrait de réunir les propriétés spécifiques des différents composants pour agir en synergie, et ce dans un nouveau matériau « composite ». La dispersion de charges à l'échelle nanométrique se révèle particulièrement intéressante : ayant des surfaces spécifiques importantes permettant l'augmentation de l'interface entre les charges et la matrice, elles permettent une amélioration des propriétés du matériau pour des faibles taux de charges par rapport à des charges micrométriques.

Les principales études réalisées jusqu'à présent sur des charges nanométriques ont été consacrées aux nanocharges inorganiques telles que les argiles et les silices ou des charges organiques comme les nanotubes de carbone. Une approche originale réside donc dans la synthèse de nanoparticules de polymères biosourcés présentant des propriétés fonctionnelles intéressantes qui pourraient être utilisées dans le développement de composites nanostructurés et totalement biosourcés.

C'est dans ce contexte que le projet qui a conduit à cette thèse de doctorat est né, d'une volonté de collaboration entre deux équipes de recherche, d'une part l'équipe des fluides supercritiques appartenant à l'axe de recherche sur la génération du solide divisé par des procédés innovants et durables du Centre RAPSODEE (UMR-CNRS 5302) de l'école des Mines d'Albi-Carmaux et d'autre part le pôle Matériaux Polymères Avancés du centre C2MA de l'école des Mines d'Alès. Ainsi, en combinant leurs compétences respectives et complémentaires, l'objectif est, de produire un matériau composite nanostructuré et totalement biosourcé par des procédés innovants utilisant le CO<sub>2</sub> supercritique.

Ce travail de thèse s'est organisé en trois phases principales: la première a consisté en un état de l'art des principaux polymères biosourcés possédant des propriétés fonctionnelles spécifiques, la deuxième a porté sur l'étude expérimentale de la mise en forme de nanoparticules par un procédé de génération de particules assisté par CO<sub>2</sub> supercritique et enfin la dernière a consisté à élaborer par un procédé en voie fondue, des biocomposites nanostructurés par incorporation et dispersion des nanoparticules préalablement générées.

Le chitosane, un amino-polysaccharide dérivé par désacétylation de la chitine qui est un polymère naturel abondant extrait principalement des carapaces de crustacés et des parois des champignons, a reçu une attention particulière dans cette étude pour la production de nanoparticules : il est non seulement facilement disponible, mais également biocompatible et biodégradable grâce à ses deux fonctions chimiques, mucoadhésif avec activité antibactérienne et cytocompatible.

Le PLA et le PHBV, les deux principaux polyesters biosourcés diffusés sur le marché, ont été choisis comme matériaux de la matrice du biocomposite : le PLA, synthétisé à partir d'acide lactique obtenu par fermentation de sucres ou d'amidon et le PHBV est produit naturellement par de nombreux microorganismes à partir de sources de carbone variées. La synthèse de PLA a été optimisée et maîtrisée depuis quelques années alors que le PHBV reste encore un matériau prometteur dont la synthèse nécessite encore d'être optimisée. Ces bioplastiques constituent une alternative intéressante dans le cadre du remplacement des polymères issus de la pétrochimie et font déjà l'objet de plusieurs applications industrielles.

Le manuscrit de thèse s'organise autour de quatre chapitres.

- Le premier chapitre est dédié à une synthèse bibliographique des différents thèmes abordés: les matériaux biocomposites et les procédés de génération de particules et d'élaboration de composites. Après une présentation générale et non exhaustive des matériaux composites issus de ressources renouvelables, des matrices et des charges à propriétés fonctionnelles, ce chapitre se poursuit par une description générale des procédés utilisés pour générer des particules du polymère biosourcé choisi, le chitosane, y compris les procédés assistés par CO<sub>2</sub> supercritique, ainsi que les procédés utilisés pour élaborer des composites thermoplastiques, en particulier le poly (acide lactique) PLA et le poly- (hydroxybutyrate co-hydroxyvalérate) PHBV ; ce chapitre se termine par un récapitulatif des différentes études portant sur les composites à base de ces deux biopolyesters et du chitosane.



- Le deuxième chapitre est consacré à la présentation des dispositifs expérimentaux et des techniques utilisées pour caractériser les différents matériaux élaborés. Deux dispositifs de génération de particules assistés par CO<sub>2</sub> supercritique sont décrits, ainsi qu'un procédé de génération traditionnel utilisé comme référence. Le dispositif utilisé pour la mise en forme des composites et les paramètres opératoires sont aussi exposés. Dans ce chapitre se trouvent également les techniques de mesure granulométrique, de la structure cristalline et du degré d'acétylation des particules de chitosane ainsi que des mesures des propriétés morphologiques et fonctionnelles des films composites. Enfin, la dernière technique de caractérisation présentée dans ce chapitre est celle de l'évaluation des propriétés antibactériennes des particules de chitosane et des films composites.
- Le troisième chapitre est dédié aux résultats expérimentaux de la phase de génération de nanoparticules. Dans ce chapitre, les protocoles expérimentaux et l'étude réalisée pour déterminer les conditions favorisant la génération des particules par les procédés utilisant le CO<sub>2</sub> supercritique sont exposés. Ensuite, les résultats des différentes caractérisations de ces particules, générées et commerciales, seront détaillés et comparés à ceux disponibles dans la littérature.
- Le quatrième et dernier chapitre rassemble les résultats expérimentaux de la caractérisation des composites obtenus dans le cadre de la deuxième phase du projet. Ce chapitre s'articule autour de deux types de caractérisation : le premier concerne les propriétés microstructurelles et morphologiques des composites, et plus précisément, l'état de dispersion des différentes particules dans la matrice, la morphologie des particules après dispersion et l'effet des particules sur la structure cristalline des matrices polymères ; le deuxième regroupe les caractérisations des propriétés fonctionnelles des composites, comme les propriétés thermiques et thermomécaniques. On y trouvera également une étude préliminaire sur les propriétés antibactériennes conférées au composite par le chitosane.

Ce manuscrit s'achève par des conclusions générales sur les travaux et les perspectives qui peuvent en être tirés.

**CHAPITRE I.**  
**CONTEXTE DU PROJET ET ETAT DE L'ART**

# I. Généralités sur les bioplastiques

## A. Définition

Le terme « bioplastique » englobe toute une famille de polymères qui sont biosourcés (par exemple le bio-polyéthylène (Bio-PE) ou encore le bio-polyéthylène téréphtalate (Bio-PET) issus de canne à sucre, qui possèdent ou non un caractère biodégradable comme les poly(hydroxy-alcanoates) PHA (Figure 1). Il est important de ne pas amalgamer le terme biosourcé qui désigne les polymères dont les matières premières sont partiellement ou totalement issues de la biomasse végétale, animale ou microbienne et le terme biodégradable qui est utilisé pour montrer l'aptitude d'un matériau à se dégrader et se décomposer sous l'action des enzymes produites par des micro-organismes : le caoutchouc naturel par exemple est un polymère biosourcé mais non biodégradable.

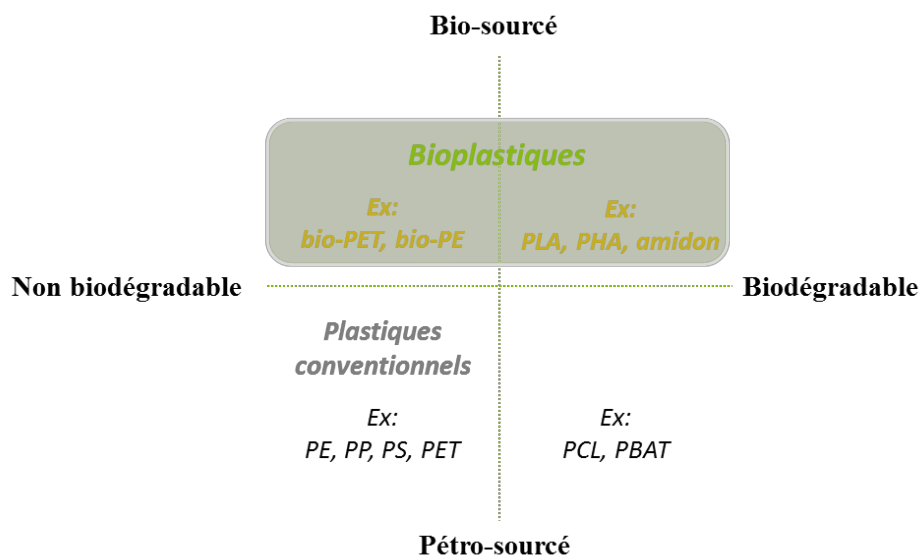


Figure 1: Répartition des biopolymères en différentes familles

Parmi tous les bioplastiques biodégradables, on peut distinguer trois grandes catégories (Figure 2) :

- les polymères naturels issus directement des ressources naturelles tels que les polysaccharides (la cellulose, l'amidon, la chitine, l'alginate, ...) et les protéines;
- les biopolyesters extraits directement des micro-organismes, produits par un processus de fermentation, tels que le PHB (poly hydroxy-butyrates) ;
- les polymères synthétisés par voie chimique ou biotechnologique à partir d'un monomère biosourcé (ex : le poly(acide lactique) PLA).

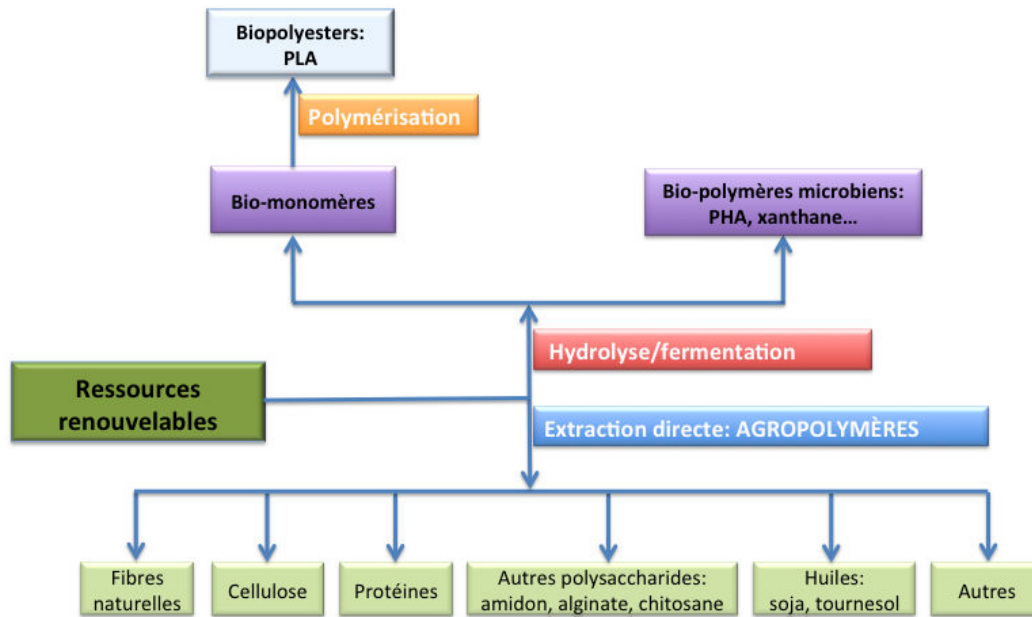


Figure 2: Les voies d'obtention de certaines familles de bioplastiques

## B. Production et utilisations industrielles

Pour illustrer l'évolution des bioplastiques en chiffres, leur production mondiale se situait en 2012 autour de 1,5 million de tonnes alors qu'elle effleurait le million de tonnes en 2010, et est estimée à plus de 6 millions de tonnes en 2018 (Figure 3). Il faut noter que cette production ne dépassait pas les 250 000 tonnes en 2009 selon la même source [1].

Au début des années 1990, les bioplastiques ont été utilisés pour fabriquer des produits à courte durée de vie et à faible valeur ajoutée tels que les sacs de déchets, de compost et l'emballage (essentiellement des bioplastiques à base d'amidon). Plus tard, poussés par une demande croissante pour des solutions durables et pour des applications plus pointues (souvent des performances mécaniques supérieures), les secteurs concernés par les bioplastiques se sont élargis pour intégrer le textile, l'automobile, le bâtiment, le médical (ingénierie tissulaire et la galénique) et le cosmétique pour n'en nommer que quelques-uns (Figure 4). L'aspect « biosourcé » a pris le pas sur l'aspect « biodégradable » des biomatériaux.

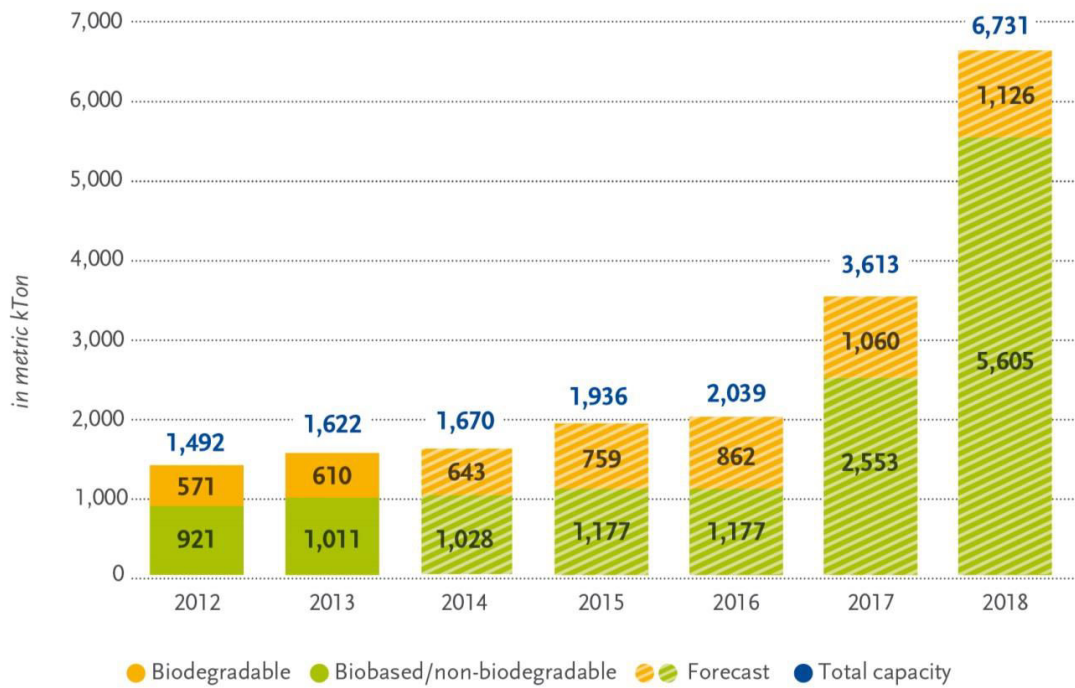
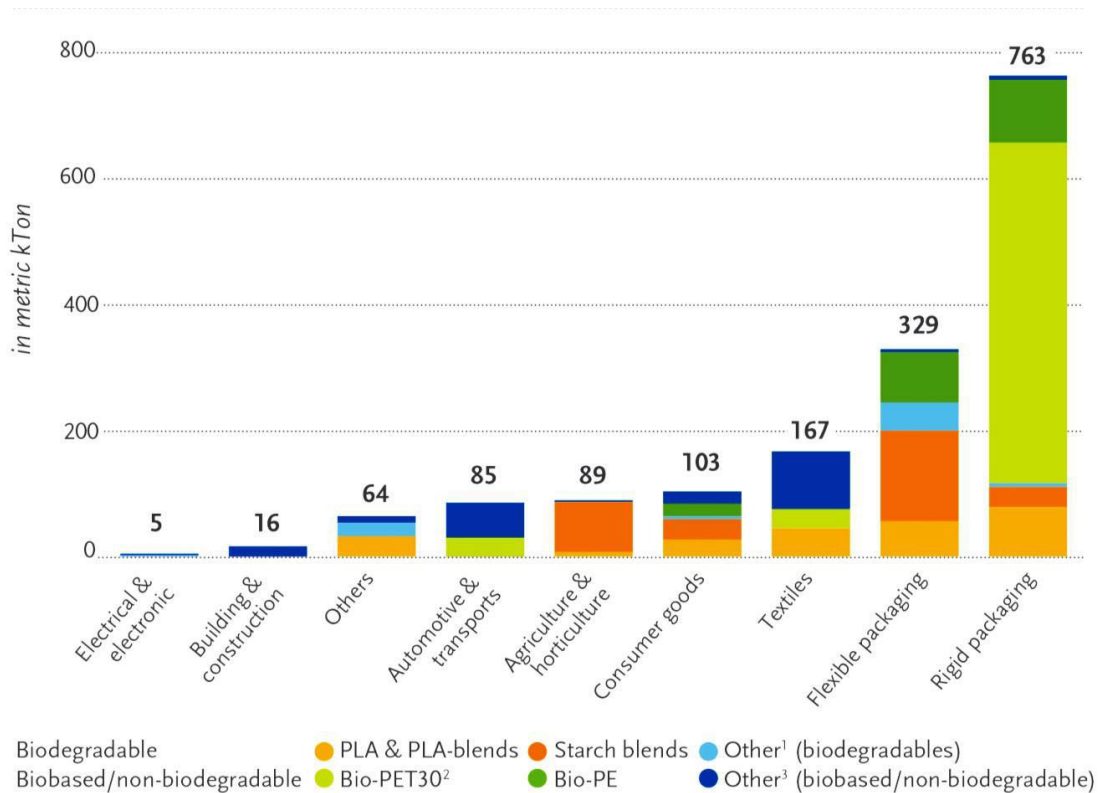


Figure 3: Evolution et prévision de la production mondiale de bioplastiques durant les dernières années [1]



Biodegradable: PLA & PLA-blends, Starch blends, Other<sup>1</sup> (biodegradables)  
 Biobased/non-biodegradable: Bio-PET30<sup>2</sup>, Bio-PE, Other<sup>3</sup> (biobased/non-biodegradable)

<sup>1</sup>Contains regenerated cellulose and biodegradable cellulose ester <sup>2</sup>Biobased content amounts to 30% <sup>3</sup>Contains durable starch blends, Bio-PC, Bio-TPE, Bio-PUR (except thermosets), Bio-PA, PTT

Figure 4: Les principaux secteurs du marché des biomatériaux en 2013 [1]

La part des polymères biosourcés non biodégradables comme le bio-PET et le bio-PE représente déjà la plus grande partie de la capacité mondiale de production de bioplastiques, utilisée principalement dans la production d'emballage et de bouteille. Cette tendance va s'amplifier dans les prochaines années, pour atteindre une estimation de 83% pour les polymères biosourcés non biodégradables. Quant à la part des polymères biodégradables, elle devrait continuer à augmenter doucement dans les prochaines années. En effet, les matériaux provenant de la biomasse sont encore très souvent en retrait en termes de propriétés mécaniques et de résistance par rapport aux polymères pétro-sourcés, ce qui limite leur utilisation.

Dans l'objectif d'améliorer les performances de ces matériaux pour répondre à un cahier des charges demandé (légèreté, rigidité, tenue thermique ...), l'assemblage d'au moins deux matériaux permet de réunir les propriétés spécifiques des différents composants pour agir en synergie, et ce dans un nouveau matériau « composite ». Le cas le plus fréquemment étudié est celui d'un polymère biosourcé dans lequel ont été incorporés des éléments de renforts tels que les fibres de verre, de carbone ou des argiles pour augmenter les propriétés mécaniques des matrices qui sont généralement moins résistantes aux sollicitations que les polymères pétro-sourcés non renforcés. Dans la thématique de l'écoconception, le remplacement des charges et des renforts d'origine fossile ou minérale par des charges et des renforts organiques biosourcés est en cours de développement dans le but d'améliorer les performances des matrices polymères comme dans le cas d'un composite pétro-sourcé. Dans ce cas, on peut utiliser des farines et des granulats végétaux (bois par exemple) comme charge et des fibres végétales comme renfort (nombreuses fibres dont le lin, chanvre, kénaf ...). Dans ce travail, nous nous intéressons plus particulièrement à des charges qui possèdent des propriétés fonctionnelles et qui ne se limitent pas uniquement au renfort mécanique qu'elles pourraient apporter. En effet, certaines catégories de polymères biosourcés sont dotées à l'état naturel de certaines propriétés spécifiques, par exemple les protéines et les polysaccharides qui seront décrits dans le paragraphe II.

Malgré l'intérêt apporté aux bioplastiques et les études réalisées dans ce domaine, la proportion des études qui portent sur les biocomposites à base uniquement de polymères biosourcés (charge + matrice) reste très faible face aux composites d'origine fossile, ce qui a conforté notre intérêt pour effectuer cette étude.

## II. Biocomposites : les constituants

Nous nous intéressons dans ces travaux aux polymères biosourcés naturels ou synthétiques pour l'élaboration de biocomposites nanostructurés (nanocomposites).

Depuis quelques années, les composites nanostructurés reçoivent une attention particulière de par leur potentiel pour augmenter les performances des produits et élargir les applications industrielles dans plusieurs secteurs, tels que le pharmaceutique (délivrance de médicaments) et le médical (médecine régénérative), le packaging, les capteurs électroniques, ... [2,3]. Un nanocomposite est un matériau dont au moins une de ses phases a une dimension nanométrique et par conséquent, une surface spécifique significativement plus importante que les charges micrométriques. Les nanostructures peuvent être sous forme de structures poreuses à l'échelle nanométrique (mousse, hydrogel, ...) ou sous forme de nanocharges (fibrillaires, lamellaires, tubulaires, particulières, ...) dispersées dans une matrice [2]. Nous nous limiterons ici aux systèmes nanochargés. La dispersion des charges à l'échelle nanométrique augmente l'interface entre les charges et la matrice et améliore certaines propriétés du matériau, comme par exemple les propriétés mécaniques ou thermiques [4], et ce pour des faibles taux de charges en comparaison aux charges micrométriques. Dans le domaine biomédical, les nanoparticules sont intéressantes pour leur faible taille comparée aux cellules humaines (quelques micromètres à quelques dizaines de micromètres), ce qui permet une circulation plus aisée à travers les vaisseaux sanguins et une meilleure vectorisation des médicaments [5].

De nombreuses études ont été réalisées sur la dispersion des charges inorganiques et leurs effets sur la matrice [6–8]. Pour notre étude, les applications visées sont orientées vers le biomédical, le pharmaceutique ou le packaging. Les nanocharges peuvent être préparées à partir d'une variété de matériaux. Le choix du matériau dépend de plusieurs facteurs dont la taille et la morphologie des particules souhaitées, la charge surfacique et la perméabilité des nanoparticules, le degré de biodégradabilité, la biocompatibilité et la cytotoxicité, et éventuellement, la teneur ou la capacité à fixer des principes actifs et le profil de libération désiré [9].

Dans ce cadre, les polymères naturels ont l'avantage d'être, la plupart du temps, biocompatibles de par leur similarité à des substances macromoléculaires reconnaissables par l'environnement biologique et le métabolisme, ce qui réduit généralement les réactions inflammatoires et la toxicité. En tenant compte de ces critères, une liste de polymères

biosourcés pouvant être utilisés comme charges se présente ; parmi cette liste, on peut identifier des protéines comme le collagène et la gélatine et des polysaccharides comme l'amidon, l'alginate et le chitosane.

## A. Les charges

### 1. Les protéines

Les protéines, généralement d'origine animale, sont constituées d'un arrangement de plusieurs monomères d'acides aminés naturels, tous porteurs d'un groupement amine et d'un groupement carboxyle (Figure 5).

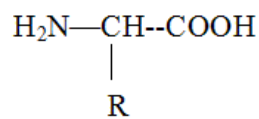


Figure 5: Formule semi-développée de l'acide aminé

Les protéines sont structurées selon l'ordre des acides aminés dans la chaîne protéique (structure primaire) selon un arrangement dû aux liaisons hydrogènes et aux interactions hydrophobes : d'hélice a, feuillets b ou pelote statistique (structures secondaires) et enfin selon le repliement dans l'espace de la chaîne polypeptidique (structure tertiaire) [10].

Dans cette catégorie, on peut noter le gluten de blé, la kératine, le collagène, la gélatine, ... Les deux dernières sont les plus souvent utilisées dans le domaine des matériaux. Elles sont biocompatibles et biodégradables. La limite majeure de cette famille de polymères est leur sensibilité à l'eau à haute température (phénomène d'hydrolyse).

Le **collagène** est un polymère abondant, présent notamment dans la structure osseuse et la peau animale et constitue 20 à 30 % de la quantité totale de protéines corporelles des mammifères [11]. C'est un polymère flexible et qui possède une structure hélicoïdale qui rend sa mise en œuvre difficile sans avoir recours à des traitements chimiques. Ses propriétés physico-chimiques et biologiques sont fortement modifiées lorsqu'il est couplé à une autre protéine ou à des agents de réticulation [12,13], ce qui favorise son utilisation dans le domaine biomédical sous forme de nanoparticules pour le transfert de certains principes actifs ou sous forme d'hydrogel pour la régénération osseuse.

La **gélatine**, un dérivé du collagène, est un polymère non-irritant, faiblement immunogène et antigène, très sensible à l'eau et soluble dans les milieux aqueux. Elle possède plusieurs



groupes fonctionnels dans sa structure chimique permettant son couplage à d'autres composés ; elle est habituellement utilisée comme gélifiant ou films de protection dans le domaine alimentaire ou pour produire des gélules et des nanoparticules dans le secteur pharmaceutique pour transporter des principes actifs [14].

Des propriétés plus détaillées de ces deux matériaux se trouvent dans les revues faites par Lee *et al.* (2001) [13] et par Gómez-Guillén *et al.* (2011) [15].

## 2. Les polysaccharides

Nombreux sont les polymères dans cette catégorie qui possèdent des propriétés spécifiques ; parmi eux, on peut noter :

L'*amidon*, un matériau semi cristallin peu coûteux provenant principalement des pommes de terre (on parlera de fécula) et des céréales, est composé de deux polymères : linéaire pour l'amylose (en général 20 à 30%) et branchée pour l'amylopectine (70 à 80 %). Le motif répétitif de ces polymères, une molécule de glucose, est présenté dans la Figure 6 [16].

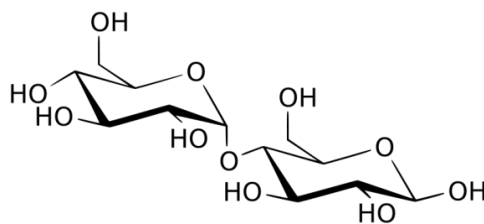


Figure 6: Motif répétitif de l'amidon : le maltose

L'amidon n'est soluble dans les milieux aqueux qu'à partir de 70 °C suite au gonflement des grains d'amidon élémentaires (gélatinisation) accompagné d'une perte de cristallinité (phénomène d'empesage) conduisant à une solution très visqueuse. Après dissolution et refroidissement, les molécules subissent un phénomène de rétrogradation où les chaînes se réarrangent, induisant une recristallisation partielle du polymère (l'amylose recristallise plus rapidement que l'amylopectine et une augmentation de la viscosité. Pour cette raison, deux variétés d'amidon composées majoritairement d'amylopectine (> 99% amidon de maïs cireux) ou d'amylose (> 65%) sont particulièrement intéressantes : la première permet d'avoir une pâte d'amidon plus stable et plus ductile et la deuxième permet d'avoir un matériau plus résistant, dû à la capacité d'enchevêtrement des macromolécules linéaires, exploré dans les domaines alimentaire et médical. Une étude plus détaillée sur la structure chimique est les propriétés de l'amidon se trouve dans les travaux de thèse de Monnet (2008) [17].

L'amidon pur et sec ne se ramollit pas et ne fond pas. Cependant, il peut être plastifié par des molécules qui se lient à l'amidon par des liaisons hydrogènes, tels que l'eau, le glycérol et le sorbitol ; on parle alors d'amidon thermoplastique (TPS ThermoPlastic Starch), qui peut être mise en forme à une température et une pression élevées sous forme de mousses ou matériaux denses [18]. La principale utilisation de l'amidon reste dans le domaine de l'emballage à cause de sa forte biodégradabilité. Cependant, du fait de son caractère hydrophile et de sa sensibilité à l'eau, l'addition d'une proportion d'autres polymères hydrophobes, d'additifs et de plastifiants pour remédier à sa fragilité est indispensable pour permettre une mise en forme stable et améliorer sa résistance mécanique [19].

L'*alginate*, un polysaccharide naturel linéaire (Figure 7) souvent extrait des algues brunes (*Phaeophyceae*), est un polymère peu cher, mucoadhésif, biocompatible, non-immunogène qui se dissout et se biodégrade dans des conditions physiologiques normales [20]. Sa solubilité dans l'eau dépend des cations présents et des micro/nanoparticules peuvent être facilement obtenues par gélification en présence d'ions calcium.

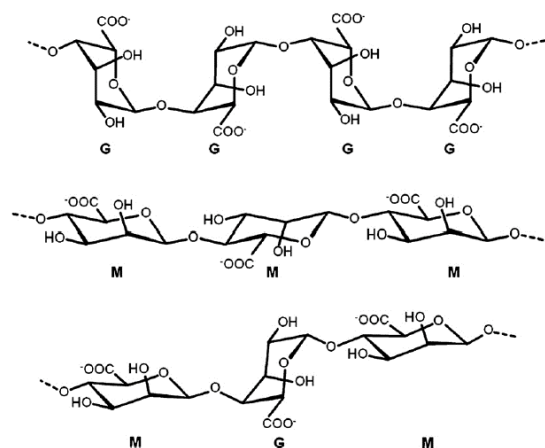


Figure 7: Les différentes structures chimiques de l'alginate : G-bloc, M-bloc et blocs alternés [20]

Il est utilisé comme agent épaississant, gélifiant ou stabilisant dans le domaine alimentaire. Dans le domaine pharmaceutique, son utilisation est particulièrement intéressante dans le transfert et la libération contrôlée de principe actif dû à la structure poreuse des gels d'alginate et dans la cicatrisation des blessures dû à l'humidité des hydrogels [21] ainsi que la culture cellulaire et la régénération tissulaire dans le domaine biomédical en raison de sa cytocompatibilité et sa biodégradabilité [22,23]

Le *chitosane* est un polysaccharide souvent obtenu par désacétylation alcaline de la chitine, le polymère naturel le plus abondant après la cellulose. Depuis les quatre dernières décennies,

l'utilisation de ce polymère s'intensifie à cause de ses nombreuses propriétés, à titre d'exemple sa biodégradabilité, sa biocompatibilité et sa non toxicité [24,25]. Ce polymère, encore très peu étudié sous forme de charge nanométrique, a fait l'objet de notre étude et sera décrit d'une manière plus détaillée dans le paragraphe qui suit.

### a. Le chitosane : origine et obtention

Le chitosane est le dérivé le plus industrialisé de la chitine (découverte au 18<sup>ème</sup> siècle). La chitine est extraite généralement des carapaces de crustacés, des cuticules d'insectes et de la paroi cellulaire des champignons. Le carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) étant l'un des principaux composants des carapaces et enrobant la chitine, l'extraction de cette dernière commence par une étape de déminéralisation en utilisant une solution acide (HCl par exemple) pour enlever le carbonate de calcium [26]. Selon l'origine, divers allomorphes de la chitine ont été distingués ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) selon la différence d'organisation structurale/spatiale des chaînes de la chitine, ce qui induit une différence de propriétés [24,26–28]. La déminéralisation est suivie d'une étape de désacétylation par une solution basique (souvent NaOH) pour obtenir le chitosane. Une étape de purification est nécessaire et consiste en un traitement enzymatique pour éliminer les protéines et un lavage supplémentaire pour supprimer le reste des pigments [29].

### b. Le chitosane : structure et propriétés

Le chitosane est un biopolymère macromoléculaire composé d'un enchaînement hétérogène de deux monomères : D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine, liés par des liaisons  $\beta$  (1-4) (Figure 8).

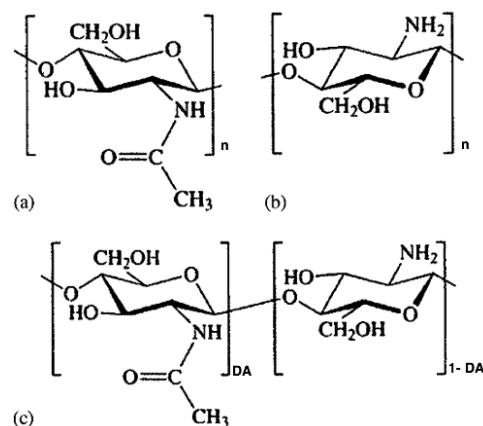


Figure 8: Structure chimique du N-acétyl-D-glucosamine (a), de D-glucosamine (b) et du chitosane (c) [24]

Le chitosane possède une structure chimique très similaire à celle de la cellulose ; la seule différence se situe au niveau du carbone C2 où le groupement hydroxyle de la cellulose est remplacé par un groupement amine ( $\text{NH}_2$ ) pour le chitosane 100% désacétylé et acétamide ( $-\text{NHAc}$ ) pour le chitosane partiellement désacétylé. Les propriétés du chitosane dépendent fortement de l'origine de la chitine et de sa structure chimique et moléculaire [28,30]. Il est ainsi nécessaire de définir les paramètres qui les qualifient, tels que la masse moléculaire et le degré d'acétylation.

#### *i. Paramètres moléculaires*

- Degré d'acétylation

La désacétylation industrielle de la chitine par la solution alcaline (méthode classique) n'est pas totale pour des raisons chimiques et techniques (risque de dégradation des macromolécules à fort taux de désacétylation ou oxydation du matériau) : des groupements amines restent alors non désacétylés. Pour cette raison, le terme « degré d'acétylation », souvent noté DA (le « degré de désacétylation » noté DD est égal à  $1-\text{DA}$ ), a été introduit pour permettre d'évaluer la quantité restante de groupements acétyles. Commercialement, lorsque le DA du copolymère est supérieur à 50 %, on parle de chitine et le chitosane désigne le copolymère dont le DA est inférieur à 50 %. Le DA est un paramètre fondamental qui a une forte influence sur les propriétés du matériau à l'échelle moléculaire et en solution, comme la solubilité, la viscosité et la flexibilité des chaînes [30]. Pour des applications très spécifiques à forte valeur ajoutée, surtout dans le domaine biomédical, le chitosane totalement désacétylé est recherché ( $\text{DA}=0\%$ ). Hormis ces applications, le chitosane obtenu par une désacétylation incomplète de la chitine est souvent utilisé (coût réduit).

Plusieurs méthodes de détermination du DA peuvent être utilisées : par mesure élémentaire du taux d'azote libre, par dosage potentiométrique, par diffraction des rayons X (DRX), par spectroscopie infrarouge (IR) [31,32] et UV ou par résonance magnétique nucléaire (RMN) [33]. Parmi toutes ces techniques, la spectroscopie IR est la plus utilisée car elle présente un bon compromis entre la simplicité, la rapidité et la précision [28].

- Masse moléculaire

La masse moléculaire (MM) constitue le deuxième paramètre important : elle dépend du procédé d'obtention qui peut induire une dépolymérisation ou une dégradation des chaînes macromoléculaires par effet mécanique ou chimique. Les chaînes de chitosane ont souvent des masses très élevées (de l'ordre de 100 à 1500  $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), mais le choix de la MM doit être

adapté à l'application pour avoir un résultat optimal [34,35] : en effet, la MM affecte la solubilité du chitosane et ses propriétés rhéologiques, notamment sa viscosité ; les solutions très visqueuses sont difficiles à manipuler : il s'agit alors de réaliser un compromis entre la rigidité du chitosane solide (favorisée par des chitosanes de haute MM) et les propriétés rhéologiques de la solution (mise en œuvre / forme plus aisée pour des polymères de MM plus faibles).

Pour déterminer la MM, il faut mettre le matériau en solution. Les méthodes classiques utilisées sont des mesures viscosimétriques [36] ou des mesures chromatographiques par perméation de gel (GPC) [33] .

*ii. Propriétés physico-chimiques et biologiques*

Comme évoqué précédemment, les propriétés physico-chimiques du chitosane (Tableau 1) dépendent fortement de sa structure et sa composition, plus particulièrement de sa MM, de son DA, de la polydispersité et de la distribution des groupements acétamides [37].

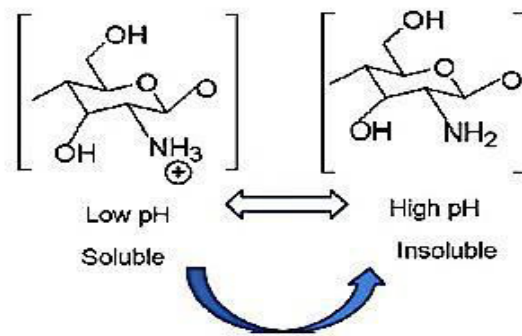
**Tableau 1: Relation entre les paramètres structuraux et les propriétés du chitosane (DD = 1-DA) [37]**

Propriétés	Caractéristiques structurales
Solubilité	↑DD
Cristallinité	↓DD
Biodégradabilité	↓DD, ↓ MM
Viscosité	↑DD,
Biocompatibilité	↑DD
<hr/>	
Biologiques	
Mucoadhésion	↑DD, ↑ MM
Analgésique	↑DD
Antimicrobien	↑DD, ↑ MM
Amélioration de la perméabilité	↑DD
Antioxydant	↑DD, ↓ MM

- Solubilité

La chitine étant insoluble dans la majorité des solvants habituels (ceci étant dû à sa forte cristallinité et aux fortes liaisons hydrogènes intermoléculaires présentes, qui rendent les amines libres non protonables), elle est difficile à mettre en œuvre, ce qui réduit son domaine d'application. Elle est souvent remplacée par le chitosane, son premier dérivé industriel, qui est plus simple à manipuler.

Le chitosane est un polyélectrolyte cationique (Figure 9), une caractéristique qui le distingue des autres polymères naturels qui sont souvent polyanioniques [37].



**Figure 9: Illustration de la protonation du chitosane lors de sa dissolution, montrant son caractère cationique [37]**

Il est insoluble dans l'eau, dans les solutions alcalines et dans les solutions acides concentrées (la faible quantité d'eau dans les solutions acides concentrées ne permet pas l'hydratation des chaînes moléculaires et leur ouverture pour permettre aux fonctions acides d'agir et dissoudre le chitosane). Il est cependant soluble dans la plupart des solutions acides diluées (souvent de l'acide acétique).

Il faut noter que la solubilité du chitosane est une propriété très difficile à contrôler car la valeur du DA influence fortement celle-ci : en effet, lorsque le DA diminue, le nombre de groupements amines augmente, favorisant ainsi la solubilité. Le chitosane industriel, ayant le plus souvent un degré d'acétylation inférieur à 30 %, possède en moyenne un  $pK_a^1$  d'environ 6,3 ; donc il est généralement parfaitement soluble à  $pH=3-4$  [28]. La solubilité dépend aussi de la nature de l'acide utilisé et de la distribution des fonctions acétyles le long de la chaîne macromoléculaire [38].

- Cristallinité

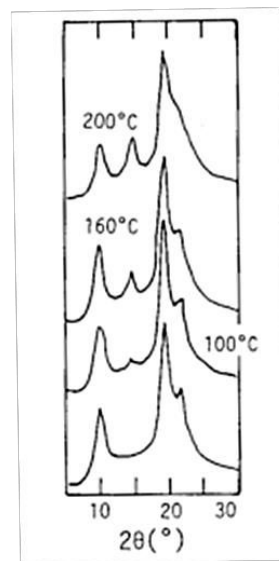
Comme la chitine, le chitosane est une substance semi cristalline et son état cristallin dépend de son origine. Différentes études ont permis de différencier 5 polymorphes du chitosane (selon l'agencement moléculaire et la teneur en eau dans les mailles unitaires) dont trois hydratés (le tendon qui est le plus abondant [39], la forme II, la forme L-2) et deux anhydres (annihilé et un autre sans nom).

Des études DRX ont permis de distinguer les structures cristallines du chitosane : les cristaux hydratés sont marqués par un grand pic de diffraction à  $2\theta=10,4^\circ$  ( $d=8,51 \text{ \AA}$ ) alors que les

---

<sup>1</sup>Le  $pK_a$  du chitosane est calculé à partir du  $K_a$  :  $K_a = \frac{[NH_2][H_3O^+]}{[NH_3^+]}$  et  $pK_a = -\log(K_a)$

cristaux anhydres provoquent un pic important à  $2\theta = 15^\circ$  (5,38 Å) (Figure 10). De plus, un halo vers  $20^\circ$  est observé pour la structure amorphe [39].



**Figure 10: Spectres de RX d'un chitosane commercial montrant l'apparition des pics des cristaux anhydres et hydratés après chauffage de la suspension aqueuse du chitosane [39]**

La cristallinité et l'agencement moléculaire sont deux paramètres importants car ils contrôlent un certain nombre de propriétés comme la solubilité, la sorption et l'accessibilité des sites internes des macromolécules, les propriétés de gonflement et de diffusion, ... Par exemple, [40] ont noté qu'un chitosane très riche en cristaux anhydres est très difficilement dissous dans les solvants du chitosane, cependant, il possède une forte résistance mécanique ; d'un autre côté, la structure amorphe, étant perméable à la vapeur d'eau et l'éthanol et soluble dans les solutions acides, leur semble être la plus adéquate pour la mise en œuvre du chitosane.

Par conséquent, lors de son utilisation, il faut prendre en compte l'influence inévitable de l'origine du chitosane sur ses propriétés [30].

De plus, des études ont montré la dépendance de la cristallinité du degré d'acétylation : le taux de cristallinité ainsi que la taille cristalline augmentent avec le DA [30,41]. Selon Jaworska et *al.* (2003), la chitine complètement acétylée (DA=100 %) a été trouvée plus cristallisée que la chitine partiellement désacétylée [30]. D'un autre côté, Ogawa et Yui (1993) ont observé qu'un chitosane pur (DA=0) est plus cristallin qu'un chitosane modifié (DA>0) obtenu par acétylation partielle du chitosane pur (PAC) ou par désacétylation partielle de la chitine (PDC) [40].

L'état cristallin du chitosane dépend aussi des procédés d'obtention. Ainsi, Ogawa et Yui (1993) [40] ont constaté que, pour un même DA final (DA=30 %) et pour une même origine de matériau, l'acétylation d'un chitosane pur permettait d'obtenir un matériau moins cristallin que celui obtenu par désacétylation de la chitine : en effet, lors de la désacétylation de la chitine, les groupements acétyles ont une distribution en « bloc », ce qui conserve une certaine cristallinité, alors que l'acétylation du chitosane pur provoque une répartition aléatoire des groupements acétyles réduisant ainsi sa cristallinité et en particulier, les cristaux anhydres.

En addition à tous ces facteurs susceptibles d'influencer la cristallinité lors de la mise en solution du chitosane, la cristallinité du produit final dépendra aussi du traitement secondaire éventuel (précipitation, séchage, lyophilisation ...). La mise en solution du chitosane puis le séchage affectent énormément l'état cristallin du chitosane : malgré l'aspect maintenu de la structure cristalline après la dissolution-séchage, une baisse de l'intensité des pics de cristallinité a été observée par Jaworska et *al.* (2003) [30]. De plus, le séchage par lyophilisation a provoqué une réduction plus sévère de la cristallinité du chitosane que le séchage au four malgré une taille de cristaux plus importante. Aucune explication n'a été fournie par les auteurs sur ce phénomène.

Ogawa (1991) a étudié l'effet du chauffage de la suspension du chitosane sur ses propriétés : il a observé que le chitosane de faible poids moléculaire ou degré d'acétylation peut être cristallisé surtout en cristaux anhydres par élévation de température de la suspension. Lorsque le degré d'acétylation augmente, il devient difficile de produire des formes cristallines en utilisant la même technique. Il a aussi remarqué qu'à des températures industrielles standards, pour des chitosanes de faibles DA, des premiers cristaux peuvent facilement se former, ce qui pourrait éventuellement affecter certaines propriétés recherchées.

De plus, le chitosane, comme la majorité des polysaccharides, ne fond pas mais se dégrade généralement à partir de 185°C. Sa structure chimique et son caractère cationique lui confèrent un pouvoir gélifiant, chélateur et adsorbant. De plus, ses groupements amines, acétamides et hydroxyles lui donnent un caractère hydrophile tout en maintenant une propriété barrière à l'oxygène et au CO<sub>2</sub>.

- Bioactivité et applications

Le chitosane possède, à part ses propriétés physico-chimiques décrites précédemment, des propriétés biologiques intéressantes [42] : c'est un polymère biocompatible, biodégradable et



non toxique. Il est parfaitement adapté pour l'administration des médicaments comme support de principe actif ou pour l'utilisation comme excipient alimentaire. Il est également muco- et bio-adhésif : il adhère sur les tissus cellulaires souples et rigides, ce qui le rend intéressant dans l'ingénierie tissulaire comme substrat de culture cellulaire. Chatelet et *al.* (2001) [43] ont étudié l'influence du degré d'acétylation sur les propriétés biologiques des films de chitosane : le DA joue un rôle déterminant dans l'adhésion cellulaire et la prolifération mais ne modifie pas la cytocompatibilité du chitosane. Ils ont remarqué que, quel que soit le DA, tous les films de chitosane sont cytocompatibles avec les kératinocytes et fibroblastes. Cependant, quand le DA augmente, l'adhésion cellulaire, la prolifération (pour les kératinocytes) et la croissance cellulaire sur les films diminuent. Les fibroblastes ne prolifèrent pas sur les films de chitosane probablement à cause de la forte adhésion qui inhibe la prolifération. Ceci rend le chitosane à faible DA un très bon biomatériau pour la cicatrisation : une fois placé sur la plaie, il adhère aux fibroblastes et favorise la prolifération des kératinocytes provoquant la régénération de l'épiderme.

Selon certains auteurs, le chitosane est un polymère bioactif qui résiste aux attaques bactériennes et aux inflammations : il possède un caractère antifongique et antibactérien qui inhibe la croissance et la propagation des parasites [44,45]. Takahashi et *al.* (2008) ont étudié l'influence du DA sur la croissance bactérienne. Ils ont remarqué que la diminution du DA induit un effet bactéricide du chitosane qui est plus marqué sur les bactéries de gram-positif (*S. aureus*) que sur les gram-négatif (*E. coli*) [46]. Il a aussi été utilisé dans le ciblage et le traitement des tumeurs (ex : cellule cancéreuse du côlon HT29) [47,48].

Une étude réalisée par Xin-Yuan et Tian-Wei (2004) [49] a montré que le chitosane possède, en plus de sa biocompatibilité et de sa faible antigénicité, une transparence et une bonne possibilité de correction optique, une stabilité mécanique, une perméabilité aux gaz surtout à l'oxygène et une mouillabilité permettant son utilisation comme lentille de contact dans l'ophtalmologie.

Dans le secteur de la diététique, certaines études présument que le chitosane favorise la perte de masse grasseuse [50,51] : en effet, le chitosane chargé positivement, formerait des complexes avec les corps gras et les lipides chargés négativement, ce qui empêche leur absorption par le corps et favorise leur élimination. Ce mécanisme reste toujours en question [52].

L'utilisation du chitosane se trouve aussi dans de nombreux autres domaines, comme le traitement des eaux [53], la photographie, le traitement des textiles, ... Des listes plus exhaustives sur les domaines d'application du chitosane et de la chitine se trouvent dans les publications de Ravi Kumar (2000) [25], Senel et McClure (2004) [42], Khor et Lim (2003) [54] et Guibal (2004) [55].

Pour résumer, le chitosane est dérivé d'un polysaccharide naturel renouvelable et abondant, la chitine. Il a un fort intérêt économique et technique comparé aux autres polysaccharides naturels pour ses propriétés physico-chimiques qui le rendent polyvalent. Il est présent dans divers domaines comme l'alimentaire, le traitement des eaux, la cosmétique, ... Son utilisation dans le domaine biomédical est en plein essor grâce à ses nombreuses propriétés biologiques qui ont donné lieu à plusieurs publications et applications. Les applications récentes du chitosane sont souvent sous forme d'hydrogel poreux (dans l'ingénierie tissulaire pour fabriquer des tissus [56,57] ou des membranes) ou sous forme particulière (vectorisation de médicament, renfort dans les composites, ...). Dans le domaine de l'emballage, il est parmi les bioplastiques les plus prometteurs à cause de ses propriétés filmogènes et son activité antibactérienne.

Malgré tous les atouts précédemment cités, il possède des propriétés qui limitent son utilisation seul dans l'emballage et le biomédical : sa perméabilité à la vapeur d'eau ainsi que sa sensibilité à l'humidité et ses faibles propriétés mécaniques (fragilité et faible flexibilité) comparées à d'autres matériaux [58,59]. Une approche efficace pour améliorer les propriétés physiques et mécaniques du chitosane est de former des composites par l'incorporation dans une matrice de chitosane, de charges métalliques ou minérales telles que l'argile ou des nanotubes de carbones [60], l'hydroxyapatite [61]...

Une autre approche consiste à réaliser des mélanges de polymère en associant le chitosane avec des polymères ou des molécules organiques. On peut citer :

- des polyesters (PCL, PBS, PBTA, PBSA, PLA, PHB, PLGA) [62–66],
- des polysaccharides [67] tels que l'amidon [19,68], l'alginate [69], la lignine [70], la gomme de xanthane [71], la cellulose microcristalline [72],
- des protéines comme la gélatine [73],
- des plastifiants comme le sorbitol [74] et le glycérol [75], etc.

Néanmoins, à notre connaissance, parmi toutes ces études, très peu ont essayé d'exploiter les propriétés du chitosane en l'utilisant sous forme de charges particulières solides dans une

autre matrice biosourcée. Par conséquent, dans ces travaux, nous nous intéressons à la génération de nanoparticules de chitosane dans le but de l'incorporer, à l'état solide, dans une matrice biosourcée, comme nous le présentons dans la suite du manuscrit.

## **B. Les matrices**

La famille des polyesters aliphatiques, approuvée par la Food and Drug Administration (FDA), est la plus utilisée parmi les polymères biocompatibles et biodégradables [76]. Parmi cette famille, on peut noter le PLA, le PLGA, le PHB et leurs copolymères. Ce sont des polymères compostables et/ou biodégradables grâce aux liaisons ester qui s'hydrolysent en métabolites naturels non toxiques.

Dans cette étude, nous avons fait le choix de travailler avec le PLA et le PHB. Seuls ces deux polymères seront donc décrits par la suite.

### **1. Le poly (acide lactique) – PLA**

#### **a. Origine et obtention**

Le poly (acide lactique) (PLA) est un biopolyester aliphatique thermoplastique produit à partir de l'acide lactique ( $C_3H_6O_3$ ) issu généralement de la fermentation bactérienne de l'amidon et des sucres simples (Figure 11). L'acide lactique (LA) est une molécule chirale (*L*-LA et *D*-LA), ce qui induit la formation de différentes structures lors de la polymérisation de PLA : le *P-L-LA*, le *P-D-LA* et le *P-DL-LA* (nommé aussi *P-méso-LA*) ; les formes *L-LA* (isomère majoritaire à 99,5%) et *D-LA* (0,5%) sont naturellement obtenues alors que la forme *DL-LA* est synthétisée chimiquement. Une forme particulière du PLA, qui a fait l'objet d'un brevet [77], est le *P-L-LA-co-P-D-LA* qui est formé par stéréocomplexation des chaînes de *P-L-LA* et de *P-D-LA*, dont les propriétés mécaniques et thermiques se distinguent considérablement des autres formes.

Deux voies de synthèse sont pratiquées pour obtenir le PLA à partir de l'acide lactique : la polycondensation et la polymérisation par ouverture du cycle (ROP) du lactide, i.e. du dimère cyclique de l'acide lactique. Le principal désavantage de la polycondensation initialement utilisée, mise à part la longue durée du procédé, est la formation d'eau durant la polymérisation nécessitant une phase continue d'évaporation sous vide en présence d'un solvant. La polymérisation par ouverture du cycle est une méthode plus rapide et continue [2,16,78]. De plus, la polycondensation du lactide conduit à des faibles masses moléculaires du polymère synthétisé alors que la polymérisation par ouverture de cycle permet d'atteindre

des masses moléculaires plus importantes. Cette nouvelle méthode de synthèse de PLA a permis une réduction significative du prix du PLA, qui est à présent compétitif avec d'autres matériaux dégradables et pétro-sourcés.

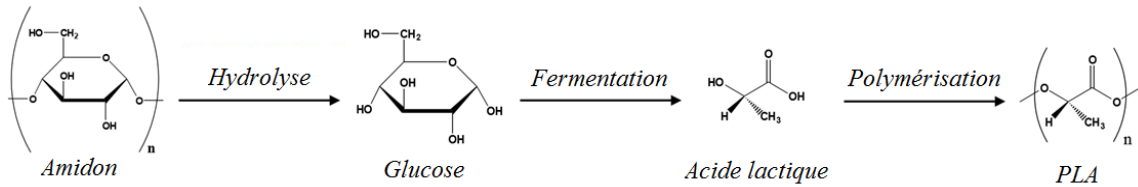


Figure 11: Méthode de synthèse du PLA

## b. Propriétés

Des études ont montré que les propriétés du PLA, comme la cristallinité, la résistance mécanique et la tenue thermique, dépendent fortement, non seulement de sa masse moléculaire, mais aussi de sa composition chimique et sa structure, en particulier des fractions des isomères L, D et DL présents, appelé aussi degré de pureté optique [79].

### i. Structure cristalline

Selon Loomis et Murdoch (1999), le P-L-LA et le P-D-LA purs possèdent une forte cristallinité, ce qui n'est pas le cas du copolymère P-DL-LA : la semi-cristallinité du PLA nécessite une pureté des monomères et une faible fraction de D-LA (cas le plus fréquent) ou de L-LA; l'augmentation de cette fraction réduit progressivement la cristallinité du matériau à cause de la présence de deux énantiomères opposés dans une même structure, jusqu'à atteindre une limite où le matériau devient complètement amorphe [77]. Cette limite de semi-cristallinité n'est pas commune à tous les auteurs : dans le cas où D-LA est la phase minoritaire, pour Auras et al. (2003) [80], la limite vaut 7%, alors qu'elle est à 10% pour Loomis et Murdoch (1999) [77], à 15% pour Lunt et Shafer (2000) [78] et 20% d'après Reddy et al. (2013) [2]. En jouant sur les proportions de L-LA et D-LA, il est possible de produire une variété de PLA allant d'un polymère complètement amorphe jusqu'au polymère 40% cristallin.

Dans le cas du P-L-LA-co-P-D-LA, Loomis et Murdoch (1999) ont trouvé que la stéréocomplexation des chaînes des énantiomères opposés engendre une distance entre chaînes plus faibles que celle entre les chaînes du même énantiomère, ce qui produit une cristallinité plus forte que les polymères purs, identifiée par un point de fusion élevé, et ceci, pour toutes les masses moléculaires testées [77].

Kolstad (1996) a remarqué l'influence négative de *D*-LA et *méso*-LA, formés lors de l'élaboration du polymère, sur la cristallinité et la cinétique de cristallisation [81]. Ce résultat est en accord avec l'étude de Huang et al. (1998) qui montre que l'ajout de 6,6% de *D*-LA au lieu de 0,4% réduit de 60 fois la vitesse de cristallisation du polymère à 117°C et l'ajout de *méso*-LA provoque une réduction de 340 fois pour les même proportion à 137°C, ce qu'ils ont expliqué par la réduction de la température de fusion à l'équilibre sous l'effet des *méso*-LA [82]. De plus, Dorgan et al. (2000) ont étudié le comportement de deux types de PLA à une teneur en *D*-LA de 4%, l'un linéaire de  $M_w=111 \text{ kg.mol}^{-1}$  et l'autre ramifié avec  $M_w=149 \text{ kg.mol}^{-1}$ ; ils n'ont pas observé d'effet de la ramification sur les températures de transitions ( $T_g$  et  $T_f$ ), cependant, une apparition d'un large pic exothermique de recristallisation et une augmentation significative du pic endothermique de fusion ont été signalées pour le polymère ramifié, signe d'une meilleure aptitude à cristalliser par rapport au PLA linéaire [83].

En tenant compte de ces effets, il est alors possible d'améliorer la structure et les propriétés du PLA en modifiant sa composition et sa structure chimique dans le but d'élargir son domaine d'utilisation

### ii. Propriétés mécaniques

Une comparaison a été réalisée pour évaluer la tenue mécanique de deux grades de PLA par rapport à d'autres polymères pétro-sourcés fréquemment utilisés dans l'industrie et plus spécialement, dans l'emballage (Tableau 2). Le PLA à très faible taux de *D*-LA (4030-D) possède un module de traction et une contrainte maximale en traction élevés mais son élongation à la rupture est très faible. Son comportement est trouvé similaire à celui du polystyrène [80].

**Tableau 2: Comparaison des propriétés mécaniques du PLA et d'autres polymères pétro-sourcés : 4030-D (98% *L*-LA), 4040-D (94% *L*-LA), MD (sens machine) et CD (sens travers) [80] (reprise)**

	4030-D		4040-D		PS	PET
	MD	CD	MD	CD	biaxial	
Contrainte maximale (MPa)	72	65	84	74	55-82	275
Allongement au seuil d'écoulement (%)	4,7	4,5	3,4	4,2	-	≈ 6
Allongement à la rupture (%)	10,7	5,5	78,2	96,9	3-40	60-165
Module élastique (GPa)	2,11	2,54	2,31	2,87	3,2	2,8-4,1

Ce grade de PLA a une bonne rigidité, mais son caractère fragile limite son utilisation dans certains domaines. Toutefois, ces propriétés mécaniques sont facilement modifiées par modification de la structure du PLA : l'augmentation du taux de *D*-LA (4040-D) augmente

remarquablement la ductilité du matériau. Schmack et al. (1999) ont également étudié l'effet du degré de pureté optique sur les propriétés mécaniques des filaments de textile à base de PLA ; ils ont trouvé qu'un PLA à 99,8% de *L*-LA est moins étirable qu'un PLA formé par 92% de *L*-LA et 8% de *DL*-lactide [84].

Le *P-L-LA-co-P-D-LA* possède des propriétés mécaniques plus performantes que le *P-L-LA* et le *P-D-LA* et plus spécifiquement le 1/1 *P-L-LA-co-P-D-LA*, lié à la présence de la phase cristalline à haut point de fusion, comme le montre le Tableau 3 [77]: ce copolymère stéréocomplexé possède une contrainte à la rupture de 50 MPa alors qu'elle n'est qu'autour de 30 MPa pour le *P-L-LA* et le *P-D-LA*. Le module de traction et l'allongement à la rupture ont subi une amélioration similaire.

**Tableau 3: Comparaison des propriétés mécaniques de différents types de copolymères *P-L-LA-co-P-D-LA* [77] (reprise)**

Ratio molaire <i>P-D-LA</i> / <i>P-L-LA</i>	Contrainte à la rupture en traction (MPa)	Module de traction (GPa)	Allongement à la rupture (%)
1 / 0	31,05 ± 1,38	1,83 ± 0,14	3 ± 1
3 / 1	36,57 ± 1,38	1,94 ± 0,06	10 ± 5
1 / 1	50,37 ± 6,21	2,35 ± 0,28	12 ± 3
0 / 1	29,67 ± 1,38	1,79 ± 0,17	3 ± 1

Les différences entre les valeurs présentées dans le Tableau 2 et le Tableau 3 pourraient être liées aux conditions de mise en œuvre qui impactent fortement les propriétés mécaniques finales du matériau [79].

Le *P-L-LA* et le *P-D-LA* sont des formes cristallisées du polymère, naturellement obtenues par la fermentation, ce qui les rend très intéressantes industriellement. Elles sont préférées pour des applications nécessitant une résistance mécanique comme l'emballage ou le textile. La forme stéréocomplexée de PLA, ayant des propriétés plus performantes, est aussi adaptée pour de telles applications.

### *iii. Propriétés thermiques*

Les propriétés thermiques du PLA, comme la transition vitreuse et la température de fusion, ont été étudiées en fonction de la stéréochimie du polymère.

Perego et al. (1996) ont trouvé que la stéréochimie du PLA n'affecte pas significativement sa température de transition vitreuse qui reste comprise entre 55 et 65°C [85].

La température de fusion quant à elle est fortement affectée par le degré de pureté optique du PLA et par sa structure. Les énantiomères d'une même famille de polymère possèdent

généralement le même point de fusion, qui a tendance à baisser lors de l'ajout des énantiomères opposés. La température de fusion du P-L-LA pur de haute cristallinité peut dépasser 190°C ; ceci génère inévitablement une dégradation des chaînes moléculaires et une dégradation thermique, ce qui réduit donc la plage de processabilité du P-L-LA. Une réduction de point de fusion est alors nécessaire et facilement réalisable par l'ajout d'une fraction de P-D-LA ou de P-DL-LA (Tableau 4). Le seul inconvénient est la baisse de la cinétique et du taux de cristallisation engendrée. Une baisse significative de la température de fusion, d'environ 50°C, a été rapportée par l'ajout de 8% de l'énantiomère opposé à un énantiomère pur [77].

Une loi empirique traduisant la chute de la température de fusion en fonction de la fraction de DL-LA a été rapportée par Auras et al. (2003) et est la suivante [80] :

$$T_m (\text{°C}) = 175 - 300 * W_m$$

où  $W_m$  est la fraction de DL-LA et 175 °C est la température de fusion du P-L-LA. Il en résulte des polymères de PLA avec une large gamme de valeurs de dureté et de rigidité.

**Tableau 4: Effet de la stéréochimie du PLA sur ses températures de transition vitreuse et de fusion [79]**

Ratio de copolymère	$T_g$ (°C)	$T_f$ (°C)
100/0 (L/D,L) –PLA	63	178
95/5 (L/D,L) –PLA	59	164
90/10 (L/D,L) –PLA	56	150
85/15 (L/D,L) –PLA	56	140
80/20 (L/D,L) –PLA	56	125

Loomis et Mardoch (1999) ont observé un double pic de fusion à 174°C et 220°C pour tous les films de P-L-LA-co-P-D-LA, ce qui n'a pas été le cas du P-L-LA et du P-D-LA qui n'ont montré qu'un seul pic de fusion à 174°C [77]. Après plusieurs cycles de chauffe au-delà de 240°C suivie d'une trempe, ils ont remarqué un décalage du pic de fusion initialement à 220°C vers des plus basses températures et une disparition du pic de fusion de faible température ; un comportement qu'ils ont attribué à la formation d'une nouvelle forme cristalline, par la complexation des chaînes des différents énantiomères, qui a un point de fusion plus élevé que celle obtenue par les énantiomères seuls.

Les mêmes auteurs ont noté une meilleure tenue thermique pour le PLA stéréocomplexé par rapport aux polymères références à base d'un seul énantiomère : après 217 minutes à 230°C, une perte de 3,8% en masse a été mesurée pour le 1/1 P-L-LA-co-P-D-LA alors qu'elle est de 9,5% pour le P-D-LA et 11,3% pour le P-L-LA.

Industriellement, le PLA souvent utilisé est obtenu à partir d'un mélange de *L*-LA et de *DL*-LA. Selon les proportions de *DL*-LA, il est soit amorphe, soit faiblement cristallin avec un point de fusion compris entre 150 et 180°C.

En plus de ces propriétés mécaniques et sa biocompatibilité, le PLA est un matériau hydrophobe, transparent avec de très bonnes propriétés optiques légèrement supérieures à celles du PS et du PET [86], ce qui le rend prometteur pour le domaine de l'emballage. Grâce à son aptitude à s'hydrolyser dans le corps humain et son caractère résorbable sans laisser des résidus toxiques, le PLA a trouvé des nombreuses applications dans les domaines médical et pharmaceutique [2,77,86] telles que les fils de sutures, implants, peau artificielle et système de libération de médicament. Son caractère compostable le rend très attrayant et le place parmi les premiers polymères biosourcés sur le marché avec un bon compromis entre les performances et le coût.

Cependant, le PLA seul reste très fragile et présente une faible cristallinité par rapport à d'autres matériaux, ce qui limite son utilisation pour des applications nécessitant une haute résistance mécanique et tenue au choc. La stabilité thermique du PLA, surtout au-delà de son point de fusion, est limitée, engendrant un risque de dégradation et d'hydrolyse des liaisons esters par des procédés de mise en œuvre tels que l'extrusion [86]. De plus, le PLA possède des faibles propriétés barrières et une tension de surface autour de 40 mN/m (dans les conditions ambiantes) équivalente au polystyrène, supérieure aux polyoléfines mais inférieure aux polyamides.

Pour surmonter ces limites, des travaux ont essayé d'incorporer des polymères et des additifs naturels dans le PLA afin de combiner leurs propriétés pour générer un nouveau biocomposite fonctionnel [86,87]. Parmi ces charges, on peut noter les argiles et les silices lamellaires [88–90], le PEBDL et montmorillonites [91], l'hydroxyapatite [92], les nanofibrilles et nanoparticules de cellulose [93], particules de chitosane [62,64], particules d'amidon et la farine de bois [94].

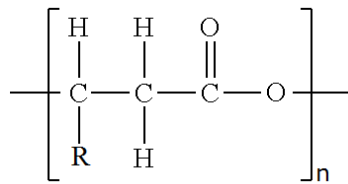
## **2. Le Poly(Hydroxybutyrate-co-hydroxyvalérate) – PHB-HV**

### **a. Origine et obtention**

Les poly (hydroxy-alcanoates) (PHA) (Figure 12) sont des biopolyesters linéaires produits biologiquement par des micro-organismes à partir de substrats carbonés, dans des conditions



de vie déséquilibrées, en proportion qui peut parfois atteindre 80% de leur masse sèche [95,96].



**Figure 12: Formule développée du PHA**

Le groupement alkyle (R) présent sur le troisième carbone du monomère varie selon les sources bactériennes, les métabolismes et les substrats utilisés, ce qui influence la masse moléculaire et les propriétés du polymère : un PHA dont le groupement R contient moins de 6 carbones possède des propriétés similaires à des thermoplastiques conventionnels alors qu'un groupement R avec plus de 6 carbones engendre les propriétés d'un élastomère [97]. Le P3HB est l'homopolymère le plus habituel du PHA et il est produit quand des éléments nutritifs (azote, phosphore, oxygène ...) sont limitants alors que les produits carbonés sont en excès. Ses copolymères – les poly(3-hydroxybutyrate-*co*-hydroxyalcanoates) – sont souvent utilisés pour leur facilité de mise en œuvre, comme le poly(3-hydroxybutyrate-*co*-hydroxypentanoate) connu habituellement sous le nom de poly(3-hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate) (P3HB-HV ou PHBV) et le poly(3-hydroxybutyrate-*co*-hydroxyhexanoate) (P3HB-HH ou PHBH) (Figure 13) [97,98]. Avec le développement de la biotechnologie, il est devenu possible de synthétiser une large variété de copolymères de P3HB [99]; cependant, leur récupération à partir des micro-organismes et leur purification restent encore des étapes très contraignantes (5 à 10 fois plus chères que pour les polymères pétro-sourcés [97,100], ce qui explique le coût encore élevé de ce polymère.

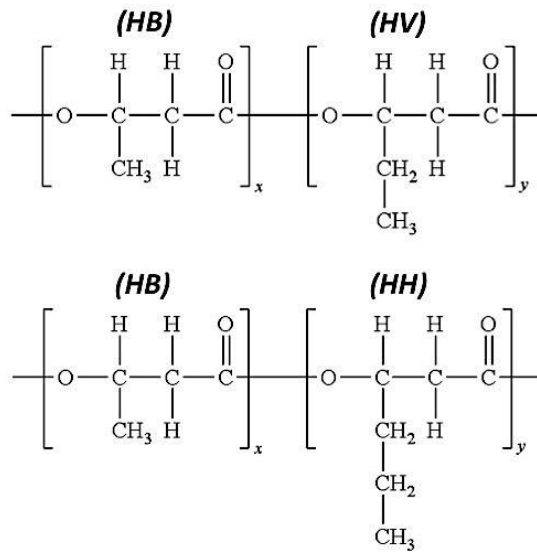


Figure 13: Formules développées du P3HB-HV et P3HB-HH

### b. Propriétés

Le PHA est un matériau biosourcé qui possède une cinétique de biodégradation élevée en conditions naturelles et qui devient plus importante en conditions de composte. La structure et les propriétés physico-chimiques des PHAs varient selon la nature et les proportions des monomères présents, ce qui permet d'obtenir une large gamme de biopolymères pour des applications diverses.

Le Tableau 5 présente les propriétés d'un P3HB-HV commercial contenant 7%mol de HV.

Tableau 5: Propriétés d'un P3HB-HV commercial Biopol D400G contenant 7%mol de HV [6]

	P3HB-HV Biopol D400G (HV=7%mol)
Densité	1,25
T <sub>f</sub> (°C)	153
T <sub>g</sub> (°C)	5
Taux de cristallinité (%)	51
Module élastique (MPa)	900
Allongement à la rupture (%)	15

#### i. Structure cristalline

Le P3HB est un polymère fortement cristallin avec un taux de cristallinité qui dépasse les 50% ce qui apporte un caractère fragile au matériau. Selon De Koning et Lemstra (1993), le P3HB, après la mise en forme, subit une seconde cristallisation à température ambiante, qui provoque le perfectionnement des cristaux et ainsi la réduction de la mobilité des chaînes amorphes entre les cristaux, induisant la fragilisation du matériau [101]. En 1994, De Koning

et al. (1994) ont proposé une annihilation du P3HB afin de limiter la seconde cristallisation : les auteurs ont étudié ce phénomène et l'ont expliqué par une réduction de l'épaisseur de l'interphase entre les cristaux et la phase amorphe, ce qui restreint la perfection des cristaux et préserve une certaine mobilité de la phase amorphe [102].

Les copolymères du P3HB ne possèdent pas la même cristallinité : Doi et al. (1995) ont montré que l'ajout de 25%mol de 3HH au P3HB a provoqué une chute importante du taux de cristallinité de 60% à 18% [103]. Abe et Doi (2002) ont testé l'effet de plusieurs co-monomères sur la cristallinité du P3HB [104]. Ils ont constaté que l'augmentation de la longueur des chaînes latérales des co-monomères provoque une réduction de la distance lamellaire et de la vitesse de croissance des sphérolites. Ceci montre que la présence des chaînes latérales du co-monomère entraîne une réduction de la cristallinité par encombrement stérique, ce qui est en accord avec les résultats de De Koning et Lemstra (1993) [101] et Gunaratne et Shanks (2005) [105]. De plus, parmi les copolymères de PHB testés, ces auteurs ont rapporté un caractère isodimorphe du P3HB-HV uniquement, où les deux monomères co-cristallisent dans un seul réseau cristallin.

#### *ii. Propriétés mécaniques*

Les films de P3HB obtenus par évaporation de solvant ou par extrusion sont généralement fragiles en raison de la forte cristallinité du matériau. Bauer et Owen (1988) ont testé la résistance en traction du P3HB entre 20 et 150°C et ils ont constaté que l'élongation du matériau ne dépasse pas 10% pour tous les échantillons [106]. Cette fragilité du matériau limite sa mise en œuvre et son utilisation.

Plusieurs démarches ont été proposées pour améliorer les propriétés mécaniques du P3HB : De Koning et al. (1994) ont annihilé le P3HB pur à 128°C pour réduire sa cristallinité et augmenter la mobilité des chaînes amorphes, ce qui a permis d'augmenter l'allongement à la rupture jusqu'à 30% (Figure 14) [102].

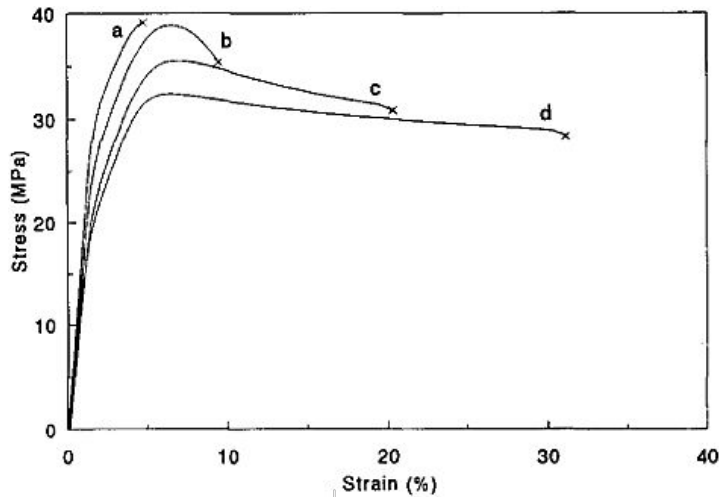


Figure 14: Effet de l'annihilation sur les propriétés mécaniques en traction du P3HB : (a) 0 min, (b) 60 min à 95°C, (c) 60 min à 115°C et (d) 30 min à 128°C [102]

Kusaka et al. (1999) ont étudié l'effet de l'étirage à chaud sur les propriétés mécaniques des films de P3HB : ils ont utilisé un P3HB de très haute masse moléculaire ( $M_w = 3000$  à  $11000 \text{ kg.mol}^{-1}$ ), obtenu en recombinant les gènes de deux bactéries différentes ; ils ont constaté que l'étirage permet d'améliorer les propriétés à partir d'un certain seuil (Figure 15) et qu'un étirage de 400% permet d'avoir une contrainte maximale de 100 MPa alors qu'elle n'est que de 41 MPa pour le film non étiré. Ils ont attribué cette amélioration à l'orientation des cristaux lors de l'étirage du film [107].

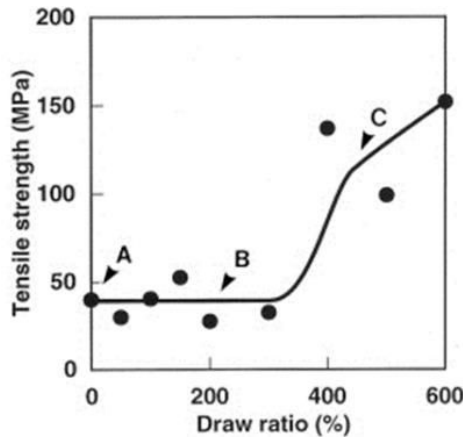


Figure 15: Evolution de la contrainte élastique d'un film de P3HB de haute masse moléculaire en fonction du taux d'étirage [107]

Une étude similaire a été réalisée par Iwata et al. en 2003 pour évaluer l'effet d'un étirage à froid de 1000% autour de la transition vitreuse suivi d'une phase d'annihilation sous tension, sur des films de P3HB obtenu à partir d'une préforme amorphe [108]. Ils ont obtenu un film unidirectionnel dont la contrainte maximale, l'élongation à la rupture et le module élastique

valent 237 MPa, 112% et 1,5 GPa respectivement. Ils ont attribué cette amélioration non uniquement à l'orientation des chaînes moléculaires durant l'étirage mais aussi à la formation d'une conformation en zigzag des cristaux.

Une méthode différente, plus fréquemment utilisée, consiste à utiliser des co-monomères comme le HV et le HH. Contrairement au P3HB, ses copolymères sont plus ductiles et flexibles : Bauer et Owen (1988) ont constaté que l'ajout de 17%mol et de 25 à 30% de HV a permis d'augmenter la déformation de la rupture à 400% [106]. De même, l'ajout de 17%mol de HH au PHB a provoqué une chute de la contrainte élastique en traction de 43 à 20 MPa, alors que cette même fraction a permis d'augmenter l'allongement à la rupture de 6% à 850%. Il faut retenir que les propriétés sont modulables en fonction de la nature et des proportions de chaque monomère [97,106,109]. Cette technique reste la plus utilisée de par les meilleures propriétés mécaniques qu'elle procure au matériau, malgré le coût de production des copolymères qui reste supérieur à celui de la production du P3HB et la baisse de cristallinité qu'elle provoque.

### iii. Propriétés thermiques

Le P3HB pur possède une température de transition vitreuse autour de 5°C et un point de fusion élevé par rapport aux autres polyesters conventionnels, compris généralement entre 170°C et 180°C, proche de son point de dégradation, ce qui rend étroite la fenêtre de mise en œuvre [110].

L'ajout des co-monomères au P3HB réduit sa cristallinité et, par conséquent, son point de fusion. Par analyse thermomécanique, Bauer et Owen (1988) ont observé que la température de ramollissement du copolymère P3HB-HV diminue quand la fraction du monomère HV augmente [106]. Abe et Doi (2002) ont noté un comportement similaire lors de l'étude de plusieurs copolymères à base de P3HB [104] : l'augmentation de la masse moléculaire des chaînes latérales provoque la diminution de la  $T_g$ ,  $T_c$  et  $T_m$  (Tableau 6).

**Tableau 6: La masse moléculaire et la température de transition vitreuse du P3HB et de trois de ses copolymères [104] (reprise)**

	Masse moléculaire		$T_g$ (°C)
	$M_n$ (kg.mol <sup>-1</sup> )	$M_w/M_n$	
P(3HB)	300	2,3	4
P(3HB-co-6 mol% 3HV)	183	2,4	0
P(3HB-co-6 mol% 3HHx)	350	2,7	-2
P(3HB-co-6 mol% mcl-3HA) <sup>a</sup>	605	2,3	-9

<sup>a</sup> mcl : longueur de chaîne moyenne (medium chain length) ; mcl-3HA composé de : 3% mol de 3HD, 3% mol d'acide hydroxydodécanoïque, 3HO (<1% mol), acide 3-hydroxy- cis -5-dodécenoïque (<1%mol).

En raison des meilleures propriétés qu'il possède par rapport au P3HB et aux autres copolymères, qui sont comparables au polypropylène, le P3HB-HV reste le polymère le plus commercialisé des PHA. Sa biocompatibilité et sa forte biodégradabilité encouragent son application dans le domaine de l'emballage, du médical (ingénierie tissulaire, fil de suture ...) et pharmaceutique [98], malgré le coût de production qui reste encore élevé.

Néanmoins, mis à part la fragilité, le P3HB et ses copolymères classiquement utilisés manquent de groupes fonctionnels réactifs, à part les groupements hydroxyles et les groupements carboxyliques en bout de chaînes. Par conséquent, pour des matériaux d'emballage, de l'ingénierie tissulaire, et d'autres applications spécifiques, l'hydrophilie, les propriétés physiques et mécaniques des PHB doivent être diversifiées et améliorées. La forte sensibilité à l'humidité du PHB, liée à l'hydrolyse des liaisons esters, limite sa fenêtre de mise en œuvre. Pour ces raisons, ces polymères ont été soit modifiés chimiquement soit mélangés avec d'autres polymères (polyéthylène oxyde PEO, polyacétate de vinyle PVAc, l'alcool polyvinylique (PVA), PLA, ...) ou charges (argiles et silice) fonctionnelles [6,111,112].

Pour éviter de s'éloigner du fil conducteur de ces travaux, dans la suite du manuscrit nous, nous allons nous limiter aux études concernant les mélanges PLA/chitosane et PHBV/chitosane. Des plus amples informations se trouvent dans les revues de Armentano et al. (2013) [86] et de Raquez et al. (2013) [87] sur les nanocomposites à base de PLA et dans les revues de Avella et al. (2000) [95] de Bordes et al. (2009) [6] et de Sinha Ray et Bousmina (2005) [113], sur les composites et nanocomposites à base de P3HB et ses copolymères.

### **III. Biocomposites : les procédés de génération**

#### **A. Procédés de génération des particules de chitosane**

La génération de particules solides constitue un intérêt industriel majeur vu leur large utilisation dans plusieurs secteurs. Malgré toute l'attention consacrée par les scientifiques, la génération des particules, leur formulation ainsi que le contrôle des propriétés restent encore non suffisamment maîtrisés.

Pour obtenir des solides divisés, deux grandes voies traditionnelles sont possibles : à partir de l'état solide avec des procédés tels que le broyage, ou à partir de l'état liquide par atomisation, cristallisation et précipitation. Des procédés de cristallisation en milieu supercritique constituent aussi une nouvelle voie de production de particules solides fines [114].

Dans le paragraphe suivant, les méthodes de génération des particules de chitosane sont détaillées ; ceci comporte les méthodes traditionnelles en voie liquide et les méthodes moins conventionnelles assistées par le CO<sub>2</sub> supercritique.

### 1. **Particules obtenues par méthodes traditionnelles**

Dans les applications thérapeutiques du chitosane comme vecteur de médicament, les micro/nanoparticules sont les structures les plus recherchées : en effet, la voie orale est la plus répandue pour l'administration des médicaments, vu sa simplicité et sa commodité.

Le choix de méthodes de génération de particules doit être basé sur les propriétés recherchées, comme la taille des particules, la stabilité thermique et chimique, la nature du principe actif, la reproductibilité, la toxicité résiduelle, ...

#### a. **Réticulation en émulsion (*emulsion cross-linking*)**

Elle est basée sur la réactivité fonctionnelle du chitosane : les fonctions amines vont interagir avec les molécules fonctionnelles de l'agent de réticulation.

Elle consiste à créer une émulsion d'une solution aqueuse de chitosane dans une solution organique en présence d'un surfactant pour stabiliser les gouttelettes aqueuses. Ensuite l'ajout d'un agent de réticulation permet de rigidifier les particules qui seront ensuite filtrées, lavées à l'alcool et séchées (Figure 16).

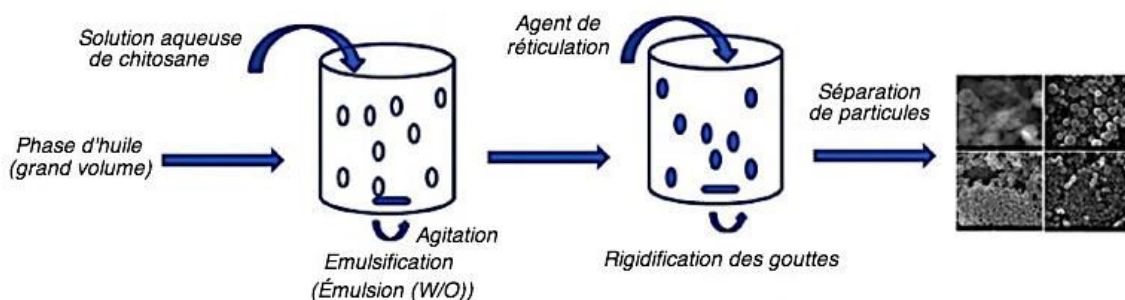


Figure 16: Principe de génération de particules de chitosane par réticulation en émulsion [37]

La taille des particules dépend des paramètres du procédé de préparation : Akbuğa et Durmaz (1994) [115] ont produit des microparticules de chitosane de 350-690 µm de diamètre.

L'inconvénient de ce type de procédé est l'utilisation de l'agent de réticulation (comme le cinnamaldéhyde) qui pourra éventuellement interagir avec un agent actif incorporé dans le matériau et l'élimination de son excès qui n'est pas toujours facile.

### b. Méthode de gélification ionique (*ionic gelation*)

Cette méthode consiste à complexer le chitosane polycationique avec une solution polyanionique : la solution de chitosane/acide acétique est rajoutée goutte à goutte dans une solution polyanionique comme le tripolyphosphate (TPP), sous agitation continue.

L'interaction électrostatique entre les fonctionnalités à charges opposées provoque la gélification ionique du chitosane qui précipite sous forme de particules sphériques (Figure 17).

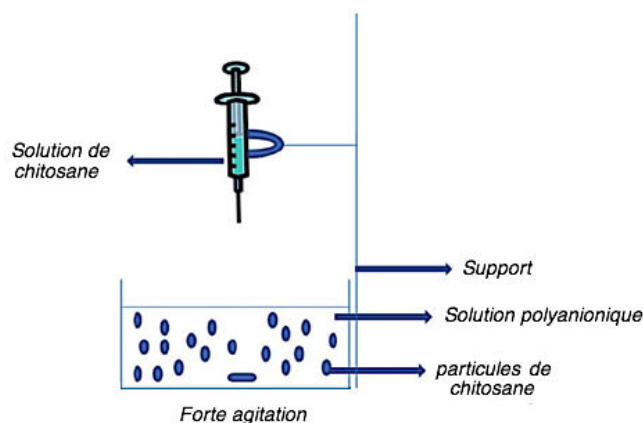


Figure 17: Principe de génération de particules de chitosane par gélification ionique [37]

Shu et Zhu (2000) ont utilisé la gélification ionique pour produire des particules contenant du chitosane et de la gélatine. La taille moyenne des particules était d'environ 1,2 mm (Figure 18) [116].

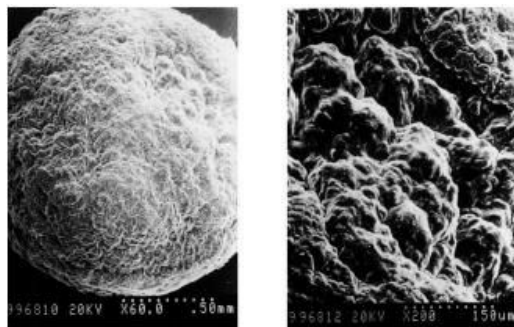


Figure 18: Images obtenues par MEB d'une bille de chitosane/TPP préparée par gélification ionique [116]

Xu et Du (2003) ont aussi étudié le complexe chitosane/TPP : des particules sphériques de tailles allant de 20 à 200 nm ont été observées par microscopie électronique en transmission (MET) (Figure 19) [35].



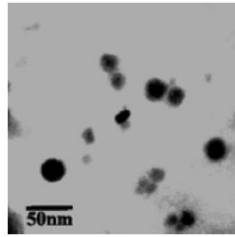


Figure 19: Image obtenue par MET des particules de chitosane préparées par gélification ionique [35]

### c. Coacervation/précipitation

Cette méthode est basée sur l'insolubilité du chitosane dans une solution basique conduisant à sa précipitation lors de la mise en contact de ce type de solution.

La solution de chitosane est soufflée par de l'air comprimé à travers une buse dans une solution alcaline, ce qui provoque sa coacervation en petites particules. Les particules sont ensuite filtrées puis lavées à l'eau (Figure 20). Le diamètre de la buse et la pression de pulvérisation sont les paramètres les plus déterminants de la taille des particules.

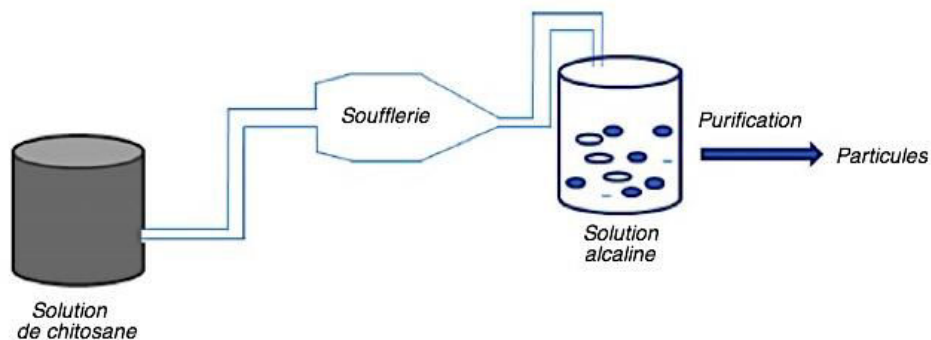


Figure 20: Principe de génération de particules de chitosane par coacervation/précipitation [37]

Mao et *al.* (2001) ont utilisé cette technique pour fabriquer des nanoparticules composites de chitosane-ADN : en étudiant les paramètres du procédé, les concentrations, le pH et les températures, ils ont réussi à obtenir, pour certains ratios chitosane/ADN, des particules de tailles comprises entre 100 et 250 nm [117].

### d. Atomisation- séchage (*spray-drying*)

C'est une méthode classique de génération de particules à partir d'une solution ou d'une suspension. Elle consiste à sécher les particules pulvérisées par un flux d'air chaud.

Dans le cas du chitosane, il est dissous dans une solution d'acide acétique et mélangé éventuellement à un principe actif avec un agent de réticulation. La solution est ensuite

pulvérisée dans un flux d'air chaud, provoquant la formation des particules suivie d'une étape de séchage, réduisant ainsi leur taille (Figure 21).

La taille des particules formées dépend de nombreux paramètres du procédé comme le diamètre de la buse et le débit de pulvérisation, la température de l'air chaud, la pression... Les particules obtenues sont toutefois souvent à l'échelle micrométrique.

He et *al.* (1999) ont réussi à générer des microparticules sphériques de taille inférieure à 10  $\mu\text{m}$  en utilisant cette méthode [118].

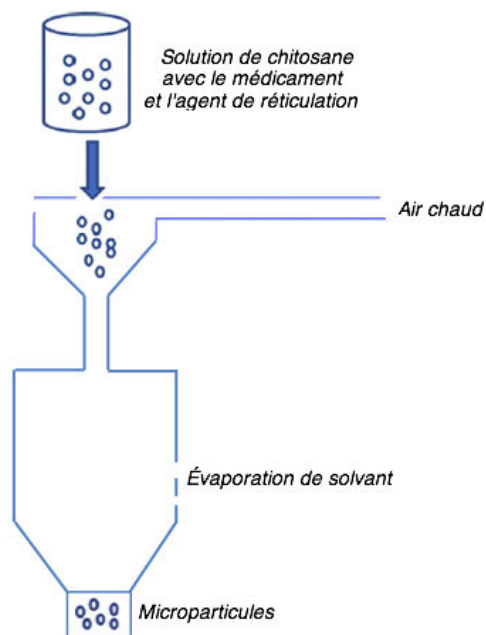


Figure 21: Principe de génération de particules de chitosane par atomisation séchage [37]

### e. Emulsion-coalescence

Comme son nom l'indique, cette méthode est basée sur les deux principes d'émulsion et de coalescence. Contrairement à la génération de particules solides de chitosane par ajout d'agent de réticulation en émulsion, c'est le rajout d'une solution alcaline qui va gélifier les gouttelettes de chitosane dans l'émulsion : en effet, deux émulsions dans l'huile séparément préparées, l'une contenant les gouttelettes de chitosane et l'autre des gouttelettes de NaOH, sont mélangées sous forte agitation. Le contact entre le chitosane et la soude provoque la précipitation des particules qui seront ensuite récupérées et lavées (Figure 22).

Tokumitsu, et *al.* (1999) ont étudié l'effet du DA sur la taille des particules formées : ils ont constaté que la taille augmente avec le DA. Pour un chitosane complètement désacétylé

(DA=0), des particules de taille moyenne de 452 nm, contenant 45% de principe actif, ont été formées [119].

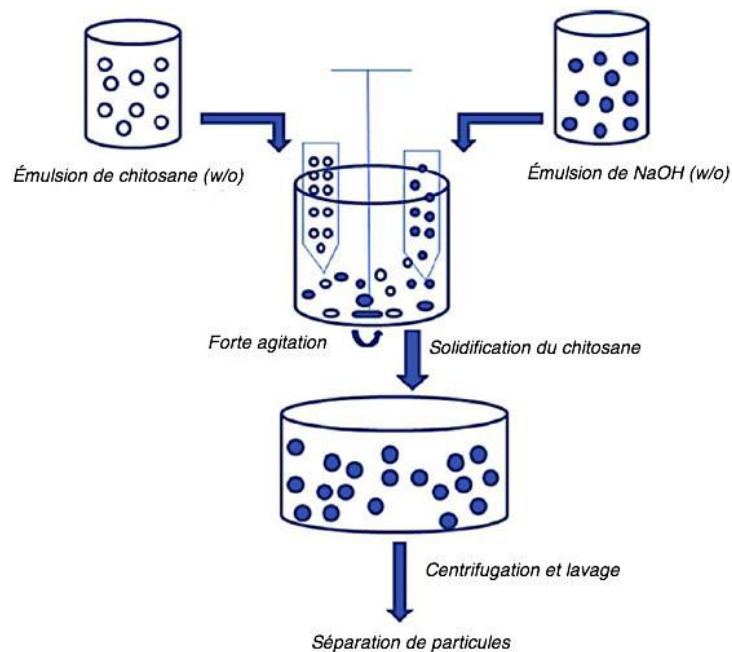
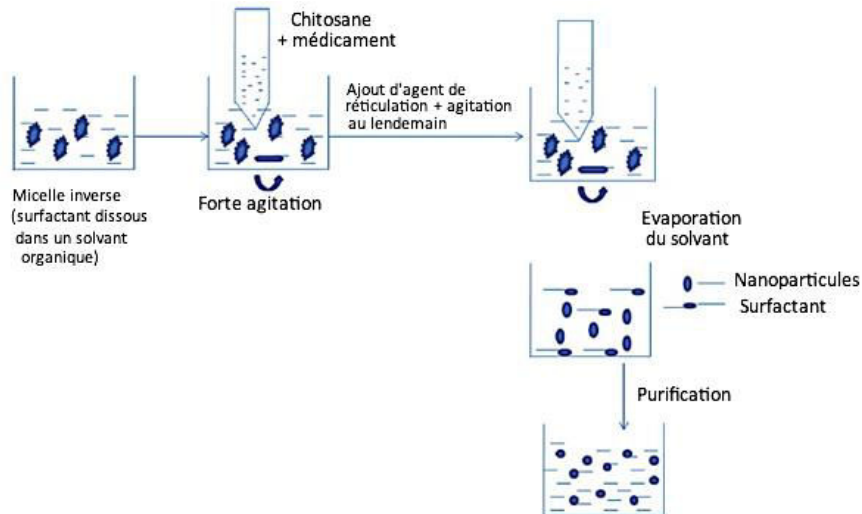


Figure 22: Principe de génération de particules de chitosane par émulsion-coalescence [37]

#### f. Méthode de micelles inverses

Les micelles inverses sont un mélange thermodynamiquement stable d'eau, de solvant organique et de surfactant : un surfactant est dissous dans une solution organique à laquelle la solution de chitosane, et éventuellement le principe actif, sont rajoutés. Une fois la solution transparente, un agent de réticulation est ajouté. Après une longue agitation, le solvant est évaporé pour récupérer les particules de chitosane solides et le surfactant. Une phase de purification est nécessaire pour éliminer le surfactant (Figure 23). Les particules sont ensuite récupérées par centrifugation.



**Figure 23: Principe de génération de particules de chitosane par méthode de micelles inverses [37]**

Les particules préparées par la méthode classique de réticulation ont généralement une taille moyenne supérieure à 200 nm. La méthode de micelles inverses permet d'obtenir des particules de taille plus réduite. Mitra et *al.* (2001) ont produit des particules de chitosane contenant le complexe dextrane-doxorubicine pour limiter la cardiotoxicité de doxorubicine libre : la taille de ces particules était de l'ordre de 100 nm avec une distribution de taille étroite [120] .

#### **g. Méthode de tamisage**

C'est une méthode développée par Agnithotri et Aminabhavi en 2004 dans l'objectif initial d'encapsuler les molécules de clozapine : elle consiste à réticuler la solution de chitosane/acide acétique pour former un gel, et à le tamiser ensuite (Figure 24). Les particules sont récupérées sur le tamis et ont une forme irrégulière dont la taille varie entre 543 et 698 μm [121] .

C'est une méthode simple à mettre en œuvre, moins fastidieuse que les autres méthodes de génération de particules.

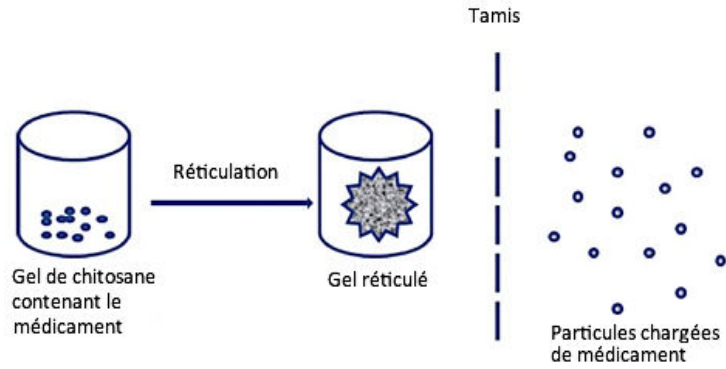


Figure 24: principe de génération de particules de chitosane par tamisage [37]

## 2. Particules obtenues par des procédés assistés par le CO<sub>2</sub> supercritique

Avant d'entamer la description des procédés assistés par CO<sub>2</sub>-sc utilisés pour générer les particules de chitosane, un court rappel s'exige sur la notion de point critique, de domaine supercritique ainsi que les procédés généraux utilisés dans ce domaine

### a. Généralités sur les fluides supercritiques

#### i. Définition

Pour mieux comprendre la notion du point critique, il faut se référer au diagramme de phases de la Figure 25.

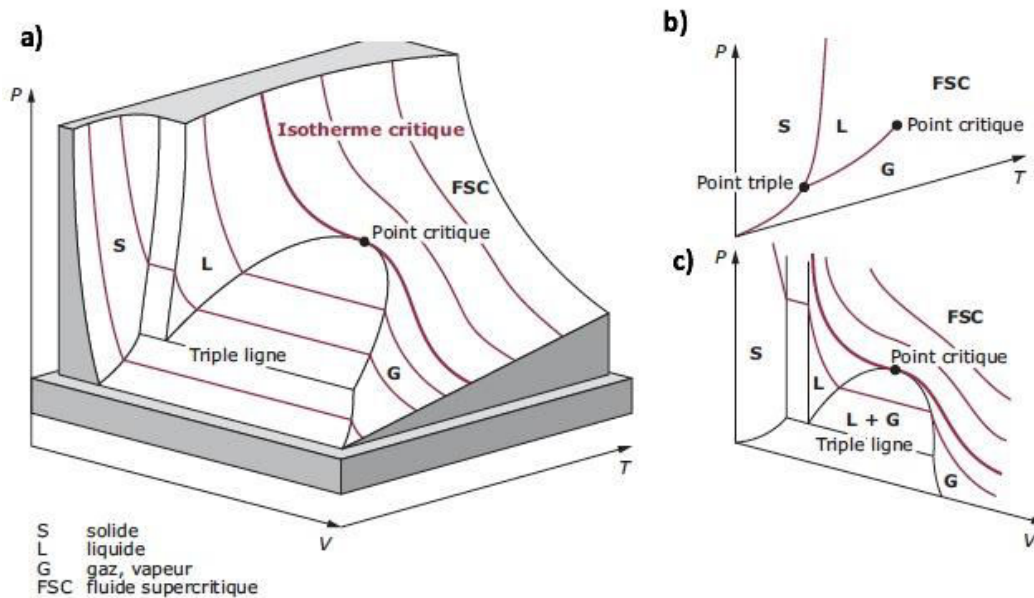


Figure 25: Diagramme de phases d'un corps pur (a) coupe tridimensionnelle P-V-T, (b) coupe P-T, (c) ligne isotherme; S = Phase Solide, G = Phase Gazeuse, L = Phase Liquide, FSC = Fluide Supercritique [122]

Tout corps pur possède un couple de température et de pression ( $T_c$ ,  $P_c$ ) qui marque la fin de la distinction entre les phases liquide et gazeuse. Ce couple ( $T_c$ ,  $P_c$ ) est appelé le point critique à partir duquel commence la zone supercritique ( $P > P_c$  et  $T > T_c$ ). Pour le  $\text{CO}_2$ , le point critique est situé à  $31^\circ\text{C}$  et  $7,29\text{ MPa}$ . Un fluide supercritique est alors un composé soumis à une température et une pression supérieures à celles de son point critique.

*ii. Propriétés*

Au voisinage du point critique, les molécules sont dans une concurrence entre un état ordonné dû aux forces intermoléculaires (état liquide) et un état dispersé dû à une énergie cinétique d'agitation de molécules (état gazeux). De ce fait, les propriétés physico-chimiques du fluide comme la densité, la viscosité, la solubilité et la compressibilité sont intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, et sont très sensibles aux variations autour de ce point (Figure 26).

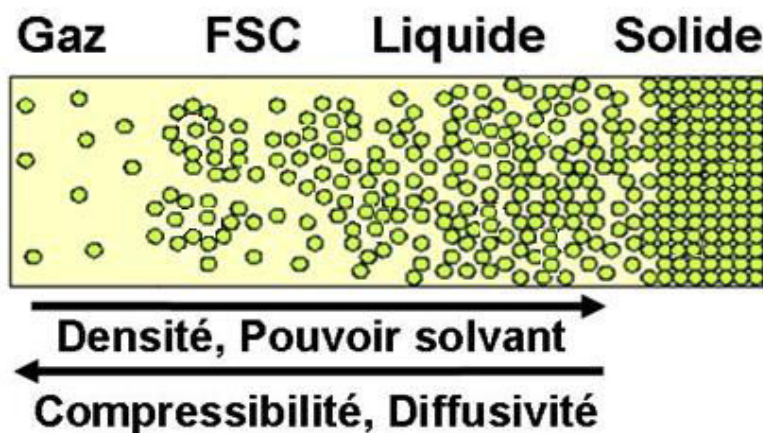


Figure 26: Evolution des propriétés physico-chimiques des différents états de la matière [123]

Le fluide supercritique (FSC) peut être décrit comme un fluide dense mais compressible possédant des bonnes propriétés de transfert massique, et à pouvoir solvant variable : une faible variation de pression est susceptible de modifier de façon drastique la solubilité du soluté dans le FSC, permettant de modifier l'équilibre des phases et provoquer une précipitation ou une solubilisation sélective. Ses bonnes propriétés de transfert grâce à une diffusivité massique élevée et sa faible viscosité lui permettent de pénétrer assez facilement dans une structure poreuse. Cette combinaison des propriétés physiques peut être avantageusement exploitée dans des opérations industrielles d'extraction, de séparation ou de génération de solides divisés. Le  $\text{CO}_2$  possède l'avantage sur les autres fluides supercritiques,

d'avoir un point critique relativement bas, d'être abondant, ininflammable, non explosif, inodore, non toxique/cancérigène tout en étant peu onéreux [124–126].

### *iii. Principaux procédés assistés par CO<sub>2</sub>-sc*

Quatre principaux procédés supercritiques peuvent se présenter, selon le rôle que joue le CO<sub>2</sub>-sc – qui peut être le soluté, le solvant ou l'anti-solvant : PGSS (*Particles from Gas Saturated Solution*), RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solution*), SAS (*Supercritical Anti-solvent*) et SAA (*Supercritical Assisted Atomization*). Nous nous contenterons ici de présenter uniquement les principes généraux. Une description plus exhaustive de ces procédés se trouvent dans le revue de Jung et Perrut (2001) [127] et les publications de Fages et *al.* (2005) [122] et Reverchon et Antonacci (2006) [128].

Dans le cas du PGSS, la dissolution du CO<sub>2</sub>-sc dans le polymère ou la matière grasse abaisse le point de fusion du matériau et permet une fusion plus aisée de ce dernier. Le refroidissement induit par la décompression brutale lors de la pulvérisation provoque la cristallisation des particules solides.

Comme le procédé PGSS, le procédé RESS se base aussi sur les deux phénomènes de dissolution et recristallisation [127,129]: le matériau est dissous dans le CO<sub>2</sub>-sc sous haute pression, ensuite la solution est pulvérisée. La chute brutale de pression provoque une baisse de densité entraînant une sursaturation importante et la cristallisation de fines particules de soluté.

Dans le procédé SAS c'est la dissolution réciproque du solvant organique dans le fluide supercritique qui crée un effet de sursaturation et provoque la précipitation des particules du soluté.

Dans le procédé SAA, le mélange et le contact entre le CO<sub>2</sub>-sc et la solution sont renforcés par l'utilisation d'un saturateur. Lors de la pulvérisation le CO<sub>2</sub>-sc agit comme agent d'expansion.

Les deux derniers procédés seront décrits d'une manière plus détaillée au cours du manuscrit.

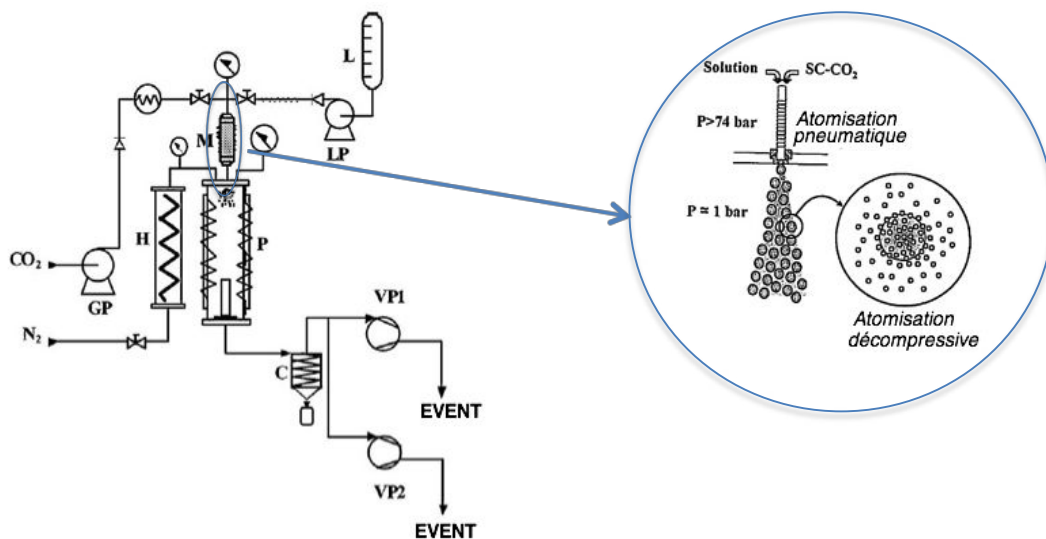
## **b. Procédés assistés par CO<sub>2</sub>-sc pour la génération des particules de chitosane**

Très peu de travaux concernent la génération des particules de chitosane en utilisant des fluides supercritiques. En 2006, Reverchon et Antonacci ont mis en place un nouveau procédé d'atomisation assistée par le CO<sub>2</sub> supercritique (SAA) [128]. La deuxième tentative n'a eu

lieu qu'en 2014 quand Shen et al. ont proposé l'utilisation d'une version améliorée du procédé SAA, l'atomisation assistée par fluide supercritique en introduisant un mélangeur par cavitation hydrodynamique afin d'améliorer les transferts de matière (Supercritical fluid assisted atomization introduced by hydrodynamic cavitation mixer, SAA-HCM) [34]

*i. Atomisation assistée par CO<sub>2</sub> supercritique (SAA)*

Ce procédé consiste à dissoudre une quantité contrôlée de CO<sub>2</sub> supercritique dans une solution contenant le chitosane à atomiser et l'acide acétique miscible avec le CO<sub>2</sub>. Le mélange a lieu dans un saturateur où le temps de résidence est élevé pour améliorer la dissolution du CO<sub>2</sub> dans la solution. Il subit ensuite une première atomisation « pneumatique » lors de son passage dans la buse d'injection (ou capillaire) qui sera suivie d'une deuxième atomisation due à la décompression dans une chambre à pression atmosphérique où règne un environnement d'azote chaud permettant le séchage des particules (Figure 27). Le CO<sub>2</sub> joue ainsi le rôle d'un co-soluté étant miscible avec la solution, et d'un agent d'expansion qui réduit au préalable la solution en petites gouttelettes [128,130].



**Figure 27 : Procédé SAA : schéma de principe: (H) échangeur de chaleur, (GP) pompe de CO<sub>2</sub>, (L) alimentation en solution; (LP) pompe pour le liquide; (M) saturateur; (P) précipitateur; (VP1, VP2) pompe à vide; (C) condensateur [130]**

Selon Reverchon et Antonacci (2006) [128], cette technique permet de mieux contrôler la taille des particules formées ainsi que la distribution des tailles. Une étude de température et de concentration de solution de chitosane C a permis d'obtenir des particules de tailles comprises en 0,1 et 10 μm à partir de 1% (v / v) de solution aqueuse d'acide acétique (Figure 28). L'avantage que ce procédé apporte, comparé aux procédés classiques assistés par CO<sub>2</sub>-sc (RESS, SAS et PGSS) est qu'il permet de travailler aussi avec des solutions aqueuses.



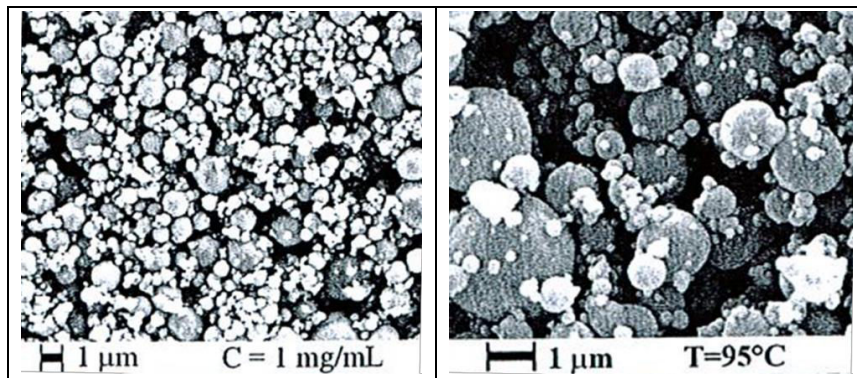


Figure 28: Particules de chitosane obtenues par le procédé SAA : (a)  $C=1 \text{ mg.mL}^{-1}$  et  $T=95^\circ\text{C}$ , (b)  $C=5 \text{ mg.mL}^{-1}$  et  $T=95^\circ\text{C}$  [128]

ii. *Atomisation assistée par  $\text{CO}_2$ -sc en introduisant un mélangeur par cavitation hydrodynamique (SAA-HCM)*

Ce procédé est similaire au SAA, à l'exception du saturateur qui est remplacé par un mélangeur par cavitation hydrodynamique (Figure 29) afin d'améliorer le transfert de matières et particulièrement la dissolution du  $\text{CO}_2$  dans la solution aqueuse acide du chitosane.

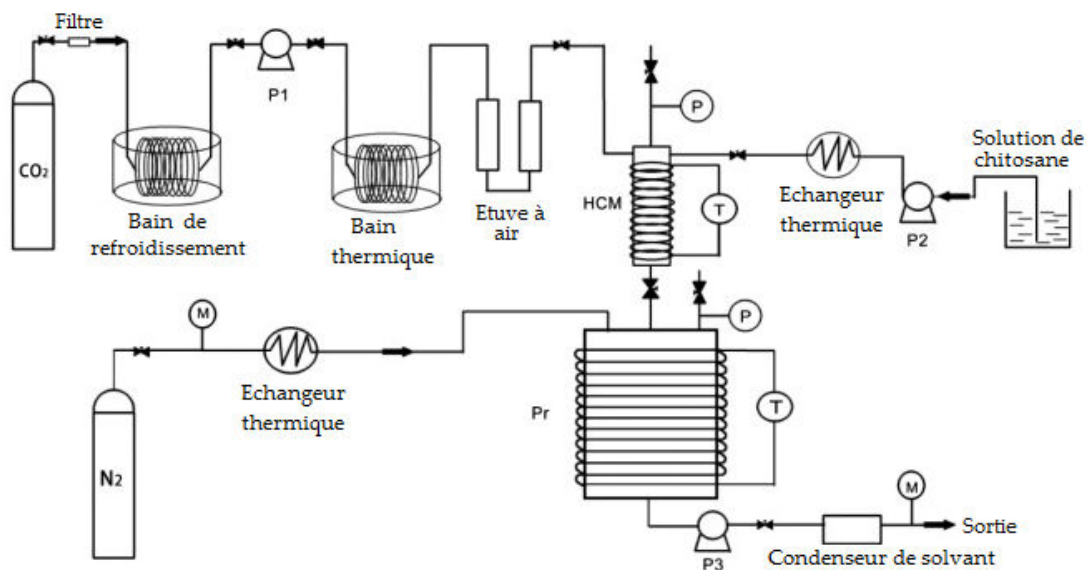


Figure 29: Procédé SAA-HCM : schéma de principe: (HCM) mélangeur par cavitation hydrodynamique, (P1, P2) pompes ; (P3) pompe à vide; (Pr) précipitateur ; (P) capteur de pression ; (T) capteur de température [34]

Via ce procédé, Shen et al. (2014) ont réussi à générer des particules de chitosane à partir de chitosanes commerciaux de trois masses moléculaires différentes ( $3, 50$  et  $300 \text{ kg.mol}^{-1}$ ) (Figure 30), avec une solution aqueuse d'acide acétique ( $1\% \text{ v/v}$ ) pour les chitosanes de hautes masses moléculaires et l'eau comme solvant du chitosane de  $3 \text{ kDa}$  [34].

En variant les paramètres du procédé comme la pression, la température dans le mélangeur, le rapport des débits massiques CO<sub>2</sub>/solution de chitosane et d'autres, ils ont réussi à générer des particules de chitosane de taille comprise entre 0,2 et 5 µm.

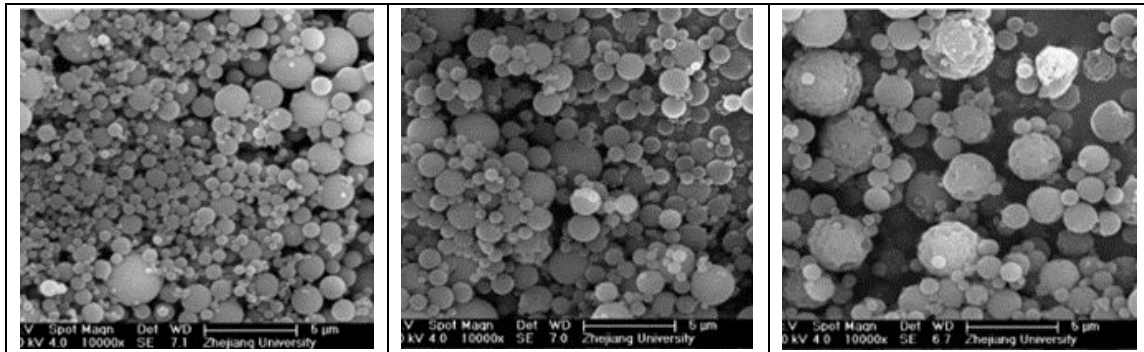


Figure 30: Particules de chitosane obtenues par le procédé SAA-HCM : (a) MM=3 kDa, (b) MM=50 kDa et (c) MM=300 kDa [34]

À notre connaissance, à l'exception du travail de Shen et al. (2014) pour générer des particules de chitosane de très faible masse moléculaire en utilisant l'eau comme solvant et un procédé assisté par CO<sub>2</sub> supercritique, toutes les autres études ont utilisé des solutions de chitosane à base d'acide acétique dans la majorité des cas, ainsi que d'autres solutions organiques; dans le cas des deux procédés assistés par CO<sub>2</sub> supercritique (SAA et SAA-HCM), le CO<sub>2</sub> est utilisé comme agent d'expansion.

Le premier objectif de cette étude sera alors d'examiner la faisabilité de deux procédés assistés par le CO<sub>2</sub> supercritique qui n'ont pas été utilisés à ce jour pour la génération des particules de chitosane, dans le but de minimiser l'utilisation de solvants organiques, tout en produisant des particules fines, nanométriques en particulier.

## B. Méthodes d'élaboration des composites biopolyester/chitosane

De manière générale, deux voies principales sont possibles pour élaborer des composites thermoplastiques: la première est par mélange des solutions des différentes phases puis évaporation des solvants ou lyophilisation [63,66,131] ou par mélange des polymères fondus, alors que la deuxième consiste à incorporer les charges solides dans une matrice fondue ou dissoute [3,132]. Cette deuxième voie comporte plusieurs techniques dont :

- 1) La dispersion des charges dans une solution de polymère puis évaporation du solvant [19,68,133-135]; elle représente la méthode la plus simple et la plus utilisée.
- 2) La dispersion des charges dans une solution de monomère puis polymérisation ou réticulation [132]

- 3) La dispersion des charges dans un polymère fondu comme par extrusion *hot-melt* [62,71,72,89].

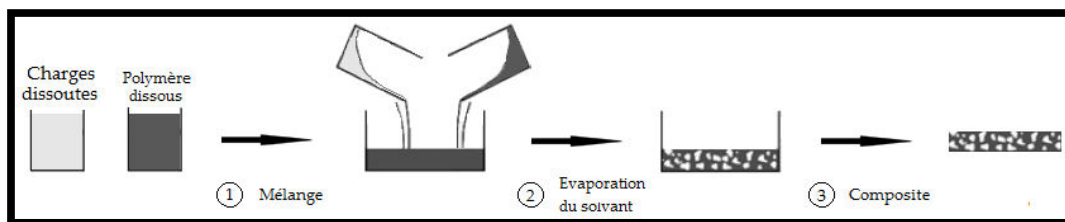
Dans le cas des composites de PLA/chitosane et PHB/chitosane, les techniques qui ont été utilisées dans la littérature se limitent au mélange de solutions et à l'incorporation des charges solides dans la matrice fondue par extrusion *hot-melt*.

## 1. Par voie en solution

### i. Solution-cast

La procédure la plus classique pour produire un composite biopolyester/chitosane consiste à préparer séparément une solution aqueuse acide de chitosane et une solution de biopolyester (souvent dans le chloroforme), puis les mélanger jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Le mélange est ensuite versé dans le moule (généralement une surface plane pour faire des films) avant séchage (

Figure 31) [63,136].



**Figure 31: Une configuration du principe de génération de composite thermoplastique par voie en solution (Solution-Cast)**

L'inconvénient majeur de cette technique est l'immiscibilité éventuelle des solvants de chaque phase, comme c'est le cas de la solution aqueuse et le chloroforme comme l'ont signalé Fimbeau et *al.* (2006) lors de la génération des films chitosane/PLA [136] ; mais malgré son importance, cet aspect n'est pas assez évoqué ou traité dans les publications traitant la génération de composite par voie de solution. Une manière d'éviter ce problème et d'obtenir un mélange homogène est d'utiliser un solvant commun pour les différentes phases, comme dans les travaux de Ikejima et Inoue (2000) où le même solvant (Hexafluoropropan-2-ol, HFIP) a été utilisé pour dissoudre le PHB-HV et le chitosane [131].

### ii. Adsorption et greffage

Une autre technique utilisée concerne la génération de particules composites : l'émulsion-diffusion [137]. Une émulsion d'une solution d'éthyle acétate saturée en eau dans

laquelle le PLA est dissous, et d'une solution d'eau saturée en éthyle acétate. L'ajout de cette émulsion à l'eau pure sous agitation provoque la diffusion de l'éthyle acétate dans l'eau et la précipitation des particules de PLA qui ont ensuite été rajoutées à une solution de chitosane pour adsorber les molécules de chitosane à la surface des particules.

Zhu et al. (2002) ont greffé les molécules de chitosane sur le film de PLA en utilisant un agent de réticulation photosensible (acide 4-azidobenzoïque) préalablement lié chimiquement au chitosane. Le greffage se fait par irradiation par lumière ultraviolet pendant 1 minute, puis le mélange est lavé et séché [138].

### *iii. Précipitation*

Yuan et al. (2008) ont produit des nanoparticules de PLA/chitosane-cholestérol par précipitation : une solution de PLA à base d'acétone est rajoutée à une solution de chitosane sous ultrasons. Le mélange est ensuite agité, lavé puis lyophilisé [139].

## **2. Par voie fondue (hot-melt extrusion)**

Le chitosane est un polysaccharide donc il ne fond pas comme les autres thermoplastiques, ce qui empêche son extrusion pour le mettre en forme. Pour trouver une autre alternative à la solution-*cast* et éviter la mise en solution du chitosane, les particules de chitosane peuvent être dispersées dans une matrice fondue à l'intérieur d'une extrudeuse par exemple. L'avantage de ce procédé par rapport à la solution-*cast* réside théoriquement 1) dans un meilleur mélange et dispersion grâce à la vis sans fin, et 2) dans la conservation des propriétés des particules solides dispersées, sauf en cas d'une éventuelle dégradation. Il est alors nécessaire de contrôler les paramètres opératoires tels que le temps de séjour, la température dans l'extrudeuse et le profil et la vitesse de rotation de vis, pour s'assurer d'une bonne dispersion des charges de chitosane dans la matrice biopolyester et de ne pas dégrader la matière à cause d'un fort cisaillement ou d'une surchauffe.

Dans la littérature, très peu d'études ont été réalisées sur le mélange biopolyester/chitosane par extrusion et, à notre connaissance, il y a uniquement deux études pour le PLA/chitosane et aucune pour le PHB-HV/chitosane :

Correlo et al, en 2005, ont dispersé des particules micrométriques de chitosane dans plusieurs films polyesters aliphatiques biodégradables (PCL, PBS, PLA, PBTA, PBSA) à l'aide d'une extrudeuse bi-vis contra-rotative (extrusion-*cast*). Dans certains cas, ils ont noté qu'au-delà d'une certaine proportion de chitosane, le couple de vis dépasse sa limite de sécurité, ce qui a

nécessité l'utilisation d'une extrudeuse bi-vis co-rotative [62]. Dans la même logique, Bonilla et *al.* (2013) ont dispersé des faibles proportions de particules de chitosane micrométriques dans une matrice de PLA, en utilisant un micro-compoundeur bi-vis [64].

Pour conserver l'aspect et les propriétés des nanoparticules solides générées par les procédés supercritiques, la technique d'extrusion hot-melt semble être la mieux adaptée dans notre cas pour disperser les nanoparticules dans les matrices biopolyesters (PLA et PHBV). Cette technique sera donc adoptée pour l'élaboration des bionanocomposites dans cette étude.

## **IV. Les composites : PLA/chitosane et PHB/chitosane**

### **A. PLA et chitosane**

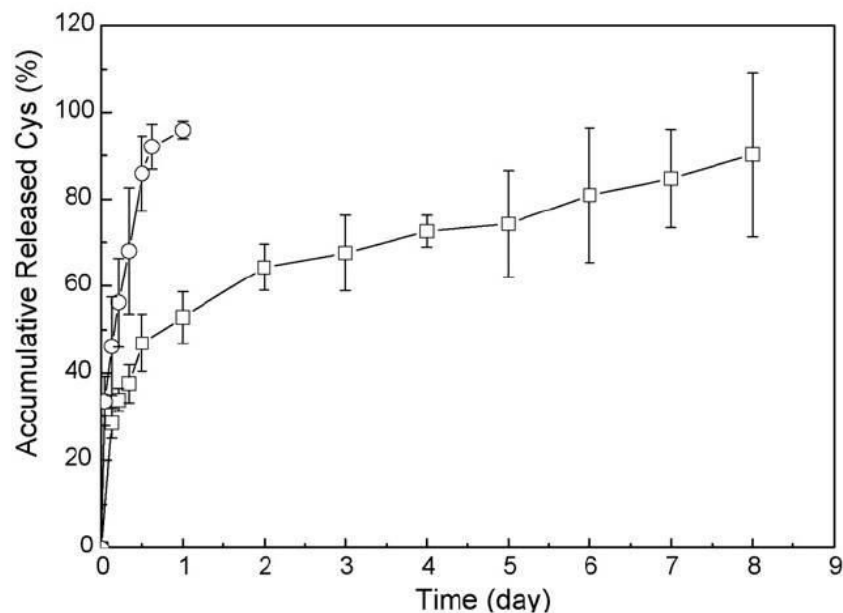
Malgré les différentes études réalisées sur les composites à base de PLA, celles qui concernent les mélanges PLA/chitosane restent encore peu nombreuses et sont principalement dédiées à des applications dans les domaines biomédical et de l'emballage, sous forme de sphères, de fibres et de films.

#### **1. Sphères composites**

Parmi ces études, on retrouve celle réalisée par Messai et *al.* (2005) qui ont préparé des nanosphères de PLA ( $251 \pm 9$  nm) par la méthode d'émulsion-diffusion sur lesquelles ils ont adsorbé du chitosane, dans le but d'évaluer la capacité de ce matériau à transporter l'ADN [137]. Ils ont remarqué que l'adsorption du chitosane sur le PLA est impactée directement par la MM et DA du chitosane : pour un DA constant, un chitosane de faible MM adsorbe moins sur le PLA et désorbe plus rapidement que le chitosane de forte MM. De même, l'augmentation du DA pour une MM constante, favorise l'adsorption et la stabilise ; selon les auteurs, cette stabilisation est due à des interactions hydrophobes entre le chitosane acétylé et le PLA. Cependant, ils n'ont noté aucune influence significative de ces deux paramètres sur la faculté du matériau à adsorber et à vectoriser l'ADN à un pH acide et un pH neutre. Ils ont expliqué l'association ADN/chitosane par trois interactions : électrostatiques par l'opposition des charges surfaciques entre l'ADN anionique et l'amine protonée (à pH acide), des liaisons hydrogènes avec l'amine primaire non protonée (pH neutre) et des interactions « hydrophobes » avec les groupements acétyles.

Une étude similaire a été réalisée par Yuan et *al.* (2008) sur des nanoparticules composites conçues par précipitation pour le transport de médicament (la rapamycine) [139]. Ils ont

étudié l'effet immunosuppresseur des nanoparticules de PLA/chitosane-cholestérol (environ 300 nm) contenant de la Rapamycine pour la greffe de cornée. Le PLA a été utilisé pour faciliter l'introduction de la rapamycine qui est très hydrophobe et améliorer son encapsulation, alors que le chitosane a été utilisé pour son activité antibactérienne. Les nanoparticules de chitosane/PLA chargées de rapamycine, grâce à l'aspect visqueux du chitosane, ont montré une meilleure capacité de rétention au niveau de la cornée par rapport à la suspension aqueuse de rapamycine lavée par les larmes. Ceci a permis une libération prolongée et continue du médicament, une meilleure durée de vie de l'implant (50% des implants non rejetés jusqu'à la fin de l'étude et 50% avec une durée de vie de 27 jours pour 2 doses d'administration par jour face à 23 jours pour la suspension de rapamycine) ainsi qu'une meilleure immunosuppression (Figure 32).



**Figure 32: Profil de libération de la rapamycine des nanoparticules de chitosane-cholestérol (○) et des nanoparticules de PLA/chitosane-cholestérol avec 25,1% de rapamycine (□). La libération est effectuée *in-vitro* dans un sérum physiologique à 37°C [139]**

## 2. **Fibres composites**

Xu et al. (2009) ont préparé, par *electrospinning* d'une solution chitosane/PLA (9/1, 2/1, 1/1, 1/1,5, 1/2 et 1/4) en utilisant l'acide trifluoroacétique comme solvant commun, des nanofibres composites pour les utiliser dans l'ingénierie tissulaire comme matrice extracellulaire (Figure 33). Ils ont remarqué que le diamètre des fibres augmente avec l'augmentation du taux du PLA dans le mélange [140]. De plus, les auteurs n'ont pas observé de différence de position des pics caractéristiques sur les spectres infrarouges des composants seuls et du mélange PLA/chitosane ; ils ont expliqué cette similitude par une mauvaise interaction entre le PLA et

le chitosane due au manque de groupement –OH sur les chaînes de PLA pour interagir avec les groupes –OH et –NH<sub>2</sub> du chitosane.

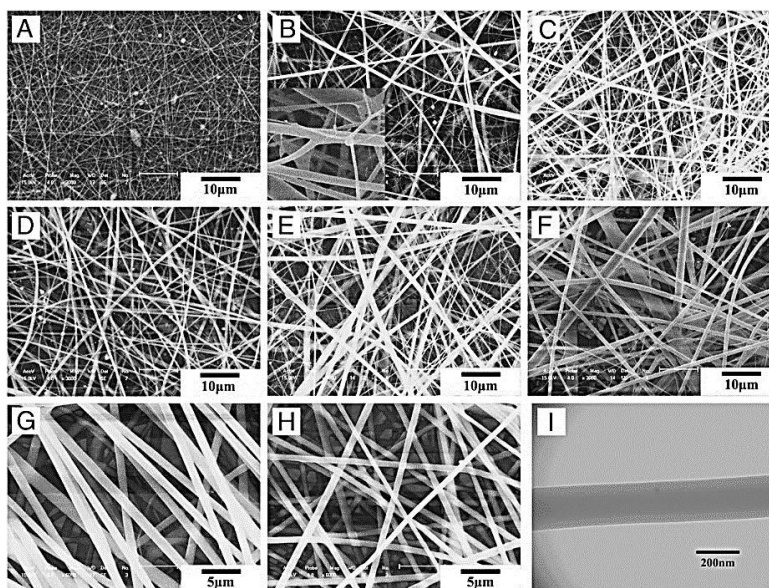


Figure 33: Clichés MEB des fibres composites chitosane/PLA obtenues par *electrospinning* à plusieurs concentrations massiques. (A) 9/1; (B) 2/1; (C) 1/1; (D) et (I) 1/1,5; (E) 1/2; (F) 1/4; (G) 1/20; (H) PLA Pur [140]

### 3. Films composites

Zhu et al. (2002) ont greffé du chitosane sur des films de PLA afin d'apporter une fonctionnalité ou une activité biologique à ces films biosourcés pour répondre à des spécifications dans le domaine biomédical [138]. La présence de chitosane, avec ses deux groupements fonctionnels, sur les films rend possible l'immobilisation d'autres molécules fonctionnelles telles que l'Héparine : la présence du chitosane seul à la surface de PLA a amélioré l'adhésion de fibroblastes par rapport au film de PLA seul (Tableau 7); la présence du complexe chitosane/héparine greffé à la surface du film PLA améliore davantage l'adhésion cellulaire tout en empêchant l'adhésion des globules blancs et leur activation.

Tableau 7: Nombre de fibroblastes L929 attachés à la surface des films composites après 12h et 24h d'incubation à 37°C. CS : chitosane ; Hp : Héparine. [138] (reprise)

	Nombre (x10 <sup>4</sup> ) après 12h	Adhésion cellulaire relative (R%)	Nombre (x10 <sup>4</sup> ) après 24h	Adhésion cellulaire relative (R%)
PLA	0,67 ± 0,5	13,9	1,06 ± 0,2	20,4
PLA/CS	1,68 ± 0,5	35	2,08 ± 0,1	40
PLA/CS/Hp	3,04 ± 0,6	63,3	3,68 ± 0,3	70,7
Control (TCPS)	4,8 ± 0,4	100	5,20 ± 0,5	100

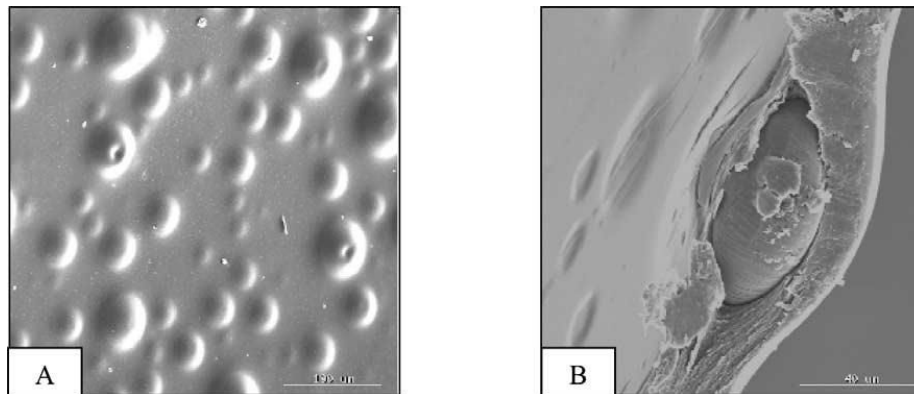
Dans la même logique, Suyatma et *al.* (2004) ont préparé des films de chitosane/PLA par solution-*cast* destinés à l'emballage biodégradable [63]. L'ajout de PLA, un bioplastique hydrophobe, au chitosane a pour but d'améliorer les propriétés barrières à la vapeur d'eau ; le chitosane reste la phase majoritaire du mélange pour maintenir l'aspect antibactérien. Malgré l'effet positif constaté du PLA à faible quantité sur la sensibilité à l'eau des films de chitosane et la perméabilité, les propriétés mécaniques des films telles que la contrainte maximale et le module élastiques ont baissé dû à l'incompatibilité et le manque d'interactions entre le chitosane et le PLA. Cette absence d'interaction se traduit sur les positions des pics caractéristiques des spectres infrarouges des mélanges PLA/chitosane qui restent inchangés par rapport aux pics des composants seuls, comme l'avait observé Xu et al. (2009) [140].

**Tableau 8: Propriétés mécaniques des films composites chitosane/PLA. Les valeurs entre parenthèses représentent l'écart-type standard. TS : contrainte maximale en traction (*tensile strength*), EB : allongement à la rupture (*elongation at break*) [63]**

Composition	TS (MPa)	EB (%)	Module de Young (MPa)
Chit/PLA : 100/0	82,4 (8,5)	5,2 (0,9)	534 (44)
Chit/PLA : 90/10	72,7 (1,8)	4,9 (0,5)	470 (20)
Chit/PLA : 80/20	64,4 (5,1)	4,2 (0,5)	433 (35)
Chit/PLA : 70/30	54,5 (2,9)	4,1 (0,5)	406 (35)
Chit/PLA : 0/100	52,5 (5,9)	3,6 (0,5)	384 (35)

Fimbeau et *al.* (2006) ont également préparé des films composites à base de PLA et du chitosane par solution-*cast* (0 à 30% mass en PLA) en présence d'un plastifiant (PEG) pour des emballages alimentaires bioactifs en combinant les propriétés antibactériennes du chitosane avec les propriétés mécaniques et barrières de PLA [136]. Ils ont noté une bonne activité antifongique de ces films composites, cependant les propriétés physico-chimiques n'étaient pas suffisantes à cause d'une hétérogénéité des films (Figure 34) due à une mauvaise miscibilité entre la solution de PLA à base de chloroforme et la solution aqueuse de chitosane.





**Figure 34: Aspect des films composites chitosane/PLA (70/30%) élaborés par la méthode de solution-cast montrant l'hétérogénéité des films due à la mauvaise miscibilité des deux solutions et des deux polymères. A : surface, B : section. [136]**

Correlo et *al.* (2005) [62] et Bonilla et *al.* (2013) [64] ont utilisé la deuxième voie d'élaboration de films composites PLA/chitosane : l'extrusion-cast.

Correlo et *al.* (2005) ont étudié les propriétés de films de PLA/chitosane à 50/50% mass: ils ont observé que l'ajout de charges solides de chitosane engendre une diminution de la contrainte maximale du matériau et de l'allongement à la rupture par rapport au PLA seul (54,3 MPa et 1,97% contre 82 MPa et 6,18% pour le PLA seul) ; ils ont affecté ces résultats à une mauvaise cohésion entre le chitosane et le PLA et à la sensibilité de ce dernier à la dégradation en présence d'humidité durant la mise en œuvre (hydrolyse). Ils ont également noté une diminution de la  $T_g$  par l'ajout de 50% de chitosane solide, ce qu'ils ont expliqué par une dégradation des chaînes du polyester par le fort cisaillement induit par la présence importante des charges. Ils ont aussi rapporté une cristallisation prématurée du PLA en présence du chitosane qu'ils ont attribuée soit à un effet nucléant des charges, soit à la réduction des longueurs des chaînes du polyester [62].

Une étude similaire a été réalisée par Bonilla et *al.* (2013) sur des films de PLA contenant des particules solides de chitosane (715 et 180  $\mu\text{m}$  à 5% et 10% mass) dans l'objectif d'évaluer l'effet du chitosane sur les propriétés physico-chimiques et antimicrobiennes du film. Ils ont signalé une augmentation de la rugosité du film en présence de charges de chitosane (Figure 35).

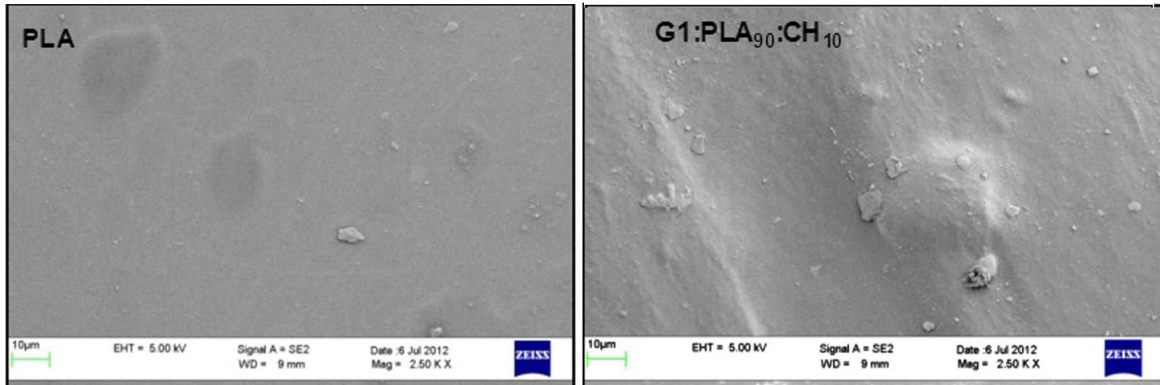


Figure 35: Clichés MEB montrant l'aspect de surface des films de PLA seul et du PLA avec 10% de chitosane (G1:PLA<sub>90</sub>:CH<sub>10</sub>) [62]

Ils ont aussi observé une diminution de la ductilité et de l'effet barrière à la vapeur d'eau par l'ajout du chitosane alors que les propriétés thermiques et le taux de cristallisation n'ont pas été affectés. Néanmoins, les films testés comme matériau d'emballage de viande ont provoqué une réduction du nombre de colonies bactériennes aérobies développées, et qui est légèrement plus marquée pour les particules de taille réduite (Figure 36).

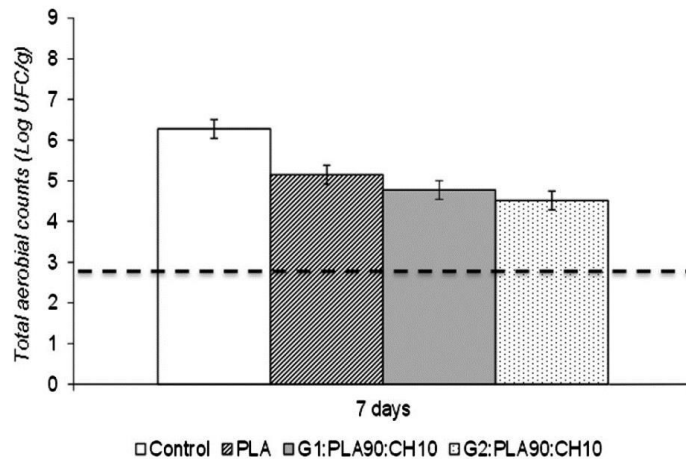


Figure 36: Dénombrement des colonies bactériennes aérobies développées sur la viande de porc couverte par un film de PLA seul et de PLA à 10% de chitosane de 715 µm de taille (G1 :PLA90 :CH10) et 180µm (G2 :PLA90/CH10). Le contrôle est une viande sans film. Tous les échantillons ont été stockés à froid. [64]

## B. PHB/chitosane

Les études réalisées sur les mélanges PHB/chitosane sont encore moins nombreuses que celles du mélange PLA/chitosane.

## 1. Films composites

Parmi ces études, on note notamment celles de Ikejima et *al.* en 1999 [65] et Ikejima et Inoue en 2000 [131], qui ont produit par solution-*cast* des films composites PHB/chitosane dans l'objectif d'améliorer le potentiel de modification chimique du PHB et de contrôler son profil de biodégradation. Lors de l'ajout de taux élevés de chitosane au PHB, ils ont constaté une baisse significative de la cristallinité du polyester, qu'ils ont expliqué par 1) une réduction de la mobilité des chaînes amorphes à cause des liaisons hydrogènes créées entre les groupements hydroxyles du chitosane et carbonyles du PHB qui empêche la réorganisation des chaînes et par 2) la rigidité des chaînes de chitosane présentes. Les auteurs ont remarqué une biodégradabilité accélérée des films biocomposites par rapport aux films de chitosane seul (Figure 37). Ceci est peut être lié au pouvoir antibactérien du chitosane qui empêche la biodégradation des films à base de chitosane seul ; la présence du PHB dans le chitosane, facilement biodégradable, a pu accélérer la dégradation des films.

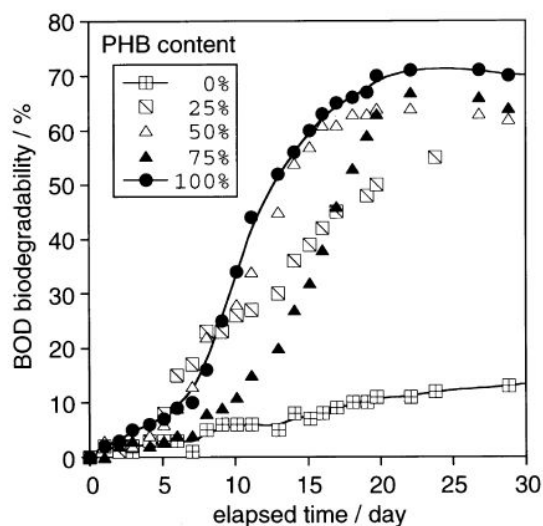
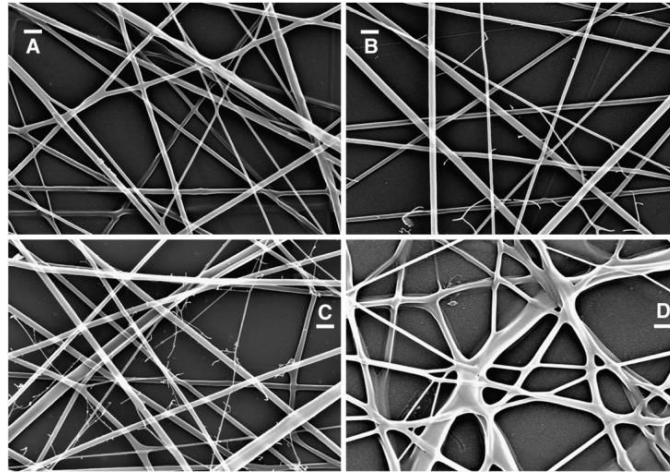


Figure 37: Biodégradation *in-vitro* des films de PHB/chitosane en fonction du temps, mesurée par DBO (Demande Biochimique en Oxygène) [131]

## 2. Fibres composites

En 2011, Veleirinho et *al.* ont préparé des membranes fibrillaires à base de PHB-HV/chitosane (5/0, 4/1, 3/2, 2/3, 1/4, and 0/5 mass) pour des applications dans le domaine biomédical [141]. Ils ont étudié la morphologie et la biodégradation du matériau en fonction de la composition du mélange en solution de P3HB-HV/chitosane : ils ont réussi à produire des nanofibrilles continues pour une solution contenant 10% du mélange de P3HB-HV/chitosane à 2/3 %mass.



**Figure 38 : Clichés MEB (grossissement  $\times 6000$ ) montrant la morphologie des fibres composites PHBV/chitosane produites par *electrospinning* des solutions à plusieurs compositions : (A) 4/1, (B) 3/2, (C) 2/3 et (D) 1/4. [141]**

Les auteurs ont rapporté une augmentation du diamètre des fibrilles quand la teneur en chitosane dans le mélange augmente ou quand la masse moléculaire du chitosane augmente. De plus, ils ont rapporté une biodégradation lente du PHBV (5% après 28 jours) ce qui n'est pas cohérent avec la désintégration naturelle rapide répandue du PHBV. Une augmentation de la vitesse de biodégradation en présence de chitosane a été observée dans ces travaux ; selon les auteurs, à un taux élevé de chitosane hydrophile, l'eau pénètre plus rapidement dans le composite, facilitant sa désintégration.

## V. Conclusions sur l'état de l'art

Dans la logique du développement durable, les biocomposites connaissent un essor depuis quelques années dans le but de remplacer les polymères issus de ressources fossiles par d'autres provenant de ressources renouvelables et naturelles.

La structuration de ces biocomposites à l'échelle nanométrique par l'addition de nanocharges permet d'améliorer certaines de leurs propriétés spécifiques pour des faibles taux de charges grâce aux surfaces spécifiques importantes développées par ces dernières.

Une approche originale réside dans la synthèse de nanoparticules de polymères biosourcés présentant des propriétés fonctionnelles intéressantes qui pourraient être utilisées pour le développement de composites nanostructurés et totalement biosourcés.

Parmi les polymères issus de la biomasse, le chitosane, un amino-polysaccharide, se distingue par ses nombreuses propriétés : c'est un matériau dérivé de la chitine, un biopolymère naturel abondant, cytocompatible, biodégradable, dont la structure chimique contient deux groupements fonctionnels et qui est reconnu pour son activité antibactérienne. Il est étudié pour de nombreuses applications dans le domaine biomédical et l'emballage mais très peu d'études ont été dédiées à sa mise à l'échelle nanométrique ou à l'incorporation de nanocharges de chitosane dans une matrice polymère biosourcée.

La génération de particules de chitosane se fait conventionnellement par des procédés nécessitant l'utilisation de nombreux solvants organiques ou des hautes températures. Une autre technologie plus innovante consiste à utiliser le CO<sub>2</sub> supercritique ; elle a permis la génération de nanoparticules de chitosane par les procédés SAA (Supercritical Assisted Atomization) et SAA-HCM (Supercritical Assisted Atomization introduced by Hydrodynamic Cavitation Mixer) à partir d'une solution acide aqueuse en utilisant le CO<sub>2</sub> supercritique comme agent d'expansion.

Le PLA et le PHBV sont deux matrices biopolyesters qui présentent l'avantage d'être à la fois biosourcées et biodégradables/compostables, ce qui explique l'intérêt grandissant qu'elles ont suscitées au cours de ces dernières années. Elles sont biocompatibles et dotées de propriétés mécaniques relativement bonnes mais elles sont désavantagées par leur stabilité thermique et dans certaines applications par leur hydrophobicité et leur manque de fonctions bioactives. Toutefois, elles sont considérées comme des matériaux prometteurs pour le biomédical et l'emballage.

Les études sur les composites à base de PLA/chitosane ou de PHBV/chitosane sont peu nombreuses et se limitent souvent à l'élaboration de mélanges en voie solvant (solution-*cast*, adsorption...). Seules deux études portent sur l'incorporation de microparticules solides de chitosane dans le PLA par voie fondue en extrusion et à notre connaissance aucune étude n'a été réalisée avec le PHBV.

Les objectifs de ces travaux sont donc de :

- générer des nanoparticules de chitosane par des procédés assistés par CO<sub>2</sub> supercritique, tout en minimisant l'utilisation de solvants organiques,
- disperser ces nanoparticules dans une matrice biopolyester, en particulier le PLA et le PHBV,
- étudier les morphologies et les propriétés des biocomposites finalement obtenus.



## **CHAPITRE II.**

# **MATERIELS, MATERIAUX ET METHODES**

Ce chapitre est consacré aux dispositifs et protocoles expérimentaux, aux matériaux et aux techniques de caractérisations utilisés dans cette thèse.

D'abord, les matériaux utilisés pour l'élaboration des biocomposites et leurs propriétés sont présentés. Ensuite, une description détaillée des dispositifs ayant servi à la génération des charges de chitosane et à la mise en forme des films composites, est donnée. En troisième étape, les différentes techniques de caractérisation morphologique, thermique, macromoléculaire, structurale et viscoélastique sont exposées.



# I. Matériaux

## A. Les matrices

### 1. Le Poly (acide lactique) – PLA

Un grade commercial de PLA dédié à l'extrusion de film (nom de référence *PLE 003*), produit par NaturePlast (France) par polymérisation par ouverture de cycle du lactide (évoquée dans le Chapitre I), a été utilisé. Ce grade de PLA se présente sous la forme de granulés conditionnés à l'état semi-cristallin. Il est recyclable et compostable selon la norme NF EN 13432 : 2000. Le grade *PLE 003* est équivalent au grade 4043D de NatureWorks.

Les principales propriétés de ce grade de PLA sont données dans le Tableau 9.

**Tableau 9: Propriétés du grade PLE003 du PLA utilisés (données fournies par NaturePlast)  
(DM : direction machine, DT : direction transverse)**

Application	Norme	PLA- <i>PLE003</i>
		Extrusion film
<b>Propriétés Générales</b>		
Densité	ASTM D792	1,24
Indice de fluidité (g/10 min) [190°C, 2,16 kg]	ASTM D1238	2 à 10
<b>Propriétés thermiques</b>		
Température de fusion (°C)		145-160
Température de dégradation (°C)		240-250
<b>Propriétés mécaniques</b>		
Contrainte de traction maximale (MPa) [DM/DT]	ASTM D882	110/145
Allongement en traction à rupture (%) [DM/DT]	ASTM D882	160/100
Module de traction (MPa) [DM/DT]	ASTM D882	3300/3800
Test de déchirure Elmendorf (g.mil <sup>-1</sup> ) [DM/DT]	ASTM D1922	15/13
<b>Propriétés barrières</b>		
Dioxygène (cc/m <sup>2</sup> /24h/atm)	ASTM D1434	675
Dioxyde de carbone (cc/m <sup>2</sup> /24h/atm)		2850
Vapeur d'eau (g/m <sup>2</sup> /24h)	ASTM F1249	375

Il est à noter que les différents grades de PLA présentent des propriétés différentes et notamment l'allongement à la rupture : les grades dédiés à l'injection, au thermoformage ou au moussage possèdent des allongements à la rupture faibles (inférieurs à 10%), alors que les grades d'extrusion film possèdent des valeurs beaucoup plus importantes de l'ordre de 100% ou plus. Cette différence de valeurs est certainement liée à la présence d'additifs dans la formulation du matériau.

Les masses moléculaires de ce matériau ont été mesurées lors de cette étude par chromatographie par perméation de gel (GPC) et les valeurs sont présentées dans le Tableau 10.

**Tableau 10: Masses moléculaires (g.mol<sup>-1</sup>) de PLA grade PLE003 mesurées par GPC**

	M <sub>w</sub>	M <sub>n</sub>	M <sub>v</sub>	M <sub>p</sub>	M <sub>z</sub>	IP
PLA granulé	163937	92135	151992	131173	253241	1,8

## 2. Le poly (hydroxy butyrate-co-valérate) – PHBV

Le PHBV est aussi fournis par la société NaturePlast (France). Il se présente sous forme de granulés de couleur brune : il s'agit d'un grade commercial (PHI 002) mélangé avec des stabilisants (dont la nature n'a pas été révélée par le fabricant) et des agents nucléants, dédié à l'injection. Selon le fournisseur ce grade contient entre 5 et 8 % mol de groupes hydroxyvalérate (HV). Les principales propriétés du grade PHI002 de PHBV stabilisé sont données dans le Tableau 11.

**Tableau 11: Propriétés du grade PHI002 du PHBV utilisés (données fournies par NaturePlast)**

Application	Norme	PHBV-PHI002
		Injection
<b>Propriétés Générales</b>		
Densité	ISO 1183	1,25
Indice de fluidité (g/10 min) [190°C, 2,16 kg]	ISO 1133	15 à 30
<b>Propriétés thermiques</b>		
Température de transition vitreuse (°C)		5
Température de fusion (°C)		145-155
Température de dégradation (°C)		200
<b>Propriétés mécaniques</b>		
Contrainte de traction à la rupture (MPa)	ISO 527	35
Allongement en traction à rupture (%)	ISO 527	2
Module de traction (MPa)	ISO 527	2950
Choc Charpy non entaillé (kJ/m <sup>2</sup> ) [4J]	ISO 179	4,8

## B. Les charges

### 1. Chitosane

Le chitosane commercial utilisé est extrait des carapaces de crevettes et fourni par la société France Chitine (France). La pureté n'est pas donnée ; des impuretés possibles peuvent être dues à de la chitine résiduelle, des sels, des composants inorganiques, des protéines, des chlorures... [142]. Une suspension de particules de ce chitosane dans l'eau a un pH de 13, ce

qui confirme la présence de l'hydroxyde de sodium dans le matériau commercial, produit résiduel de la phase de transformation de la chitine en chitosane. La viscosité donnée par le fournisseur est de 50 mPa.s, déterminée pour une solution contenant 1g de chitosane et 99 g d'acide acétique à l'aide d'un rhéomètre dynamique (viscosimètre Brookfield modèle LVT) à 25°C. Le degré d'acétylation est déterminé par spectroscopie IR par le fournisseur et par la technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) au laboratoire IMP (Ingénierie des Matériaux Polymères) de l'INSA de Lyon : il vaut 10% et 9,64% respectivement. Des mesures des différentes masses moléculaires ont également été réalisées par l'IMP par chromatographie par perméation de gel (GPC) : les masses moléculaires en nombre  $M_n$  et en poids  $M_w$  sont respectivement 79,75 kDa et 152,7 kDa, avec un indice de polydispersité  $\mathcal{D}$  de 1,9 ; l'intervalle de précision de ces résultats est inférieur à 5%.

## II. Procédés et protocoles opératoires

### A. Préparation des solutions

#### 1. Solutions de chitosane

Des solutions de chitosane de différentes concentrations ont été préparées par dispersion dans l'eau sous agitation des particules du chitosane commercial puis addition d'une quantité d'acide acétique (pureté 90%, Prolabo, France), solvant du chitosane en conditions diluées. Lorsque le mélange est limpide, et pour certaines solutions (les raisons sont détaillées ultérieurement), une quantité d'éthanol (pureté 96%, VWR, France) est rajoutée dans le but de renforcer l'effet antisolvant du CO<sub>2</sub>-sc. La composition des différentes solutions utilisées pendant le procédé SAS (décrit dans le paragraphe suivant sur les procédés de génération) est présentée dans le Tableau 12 :

**Tableau 12: Compositions des solutions de chitosane utilisées durant le procédé SAS**

	Composition massique (%)				$m_t$ (g)	pH
	Eau	EtOH	AcAc	Chit		
Sol1	87,9	0	11,0	1,1	45,5	2,38
Sol2	49,4	49,4	0,6	0,6	81	5,5
Sol3	49,1	49,1	1,2	0,6	81,5	4,9
Sol4	48,8	48,8	1,2	1,2	82	-

La solution de chitosane est ensuite filtrée sous vide à l'aide d'une membrane en nitrate de cellulose de porosité de 3  $\mu\text{m}$  pour enlever toutes les impuretés non solubilisées. La masse

d'impuretés retenue sur les membranes était de l'ordre de 6 mg, et a été considérée comme négligeable.

## 2. Suspensions de chitosane

Dans le procédé d'atomisation et de solubilisation assistées par CO<sub>2</sub>-sc (SCASA, voir le paragraphe suivant sur les procédés de génération), le pH de la suspension de chitosane est un paramètre crucial pour la dissolution ; comme le chitosane commercial contient du NaOH résiduel, les particules ont été lavées à l'eau déminéralisée afin de réduire le pH des suspensions de chitosane, jusqu'à atteindre un pH de 8. Les particules commerciales ont été filtrées sous vide à l'aide d'une membrane en nitrate de cellulose de porosité de 3µm puis séchées à l'étuve.

Plusieurs suspensions aqueuses de chitosane, à différents volumes et concentrations (Tableau 13), ont été testées par le procédé SCASA. La variation des volumes et des quantités a pour but d'évaluer leur impact sur le rendement final du procédé.

**Tableau 13: Compositions des suspensions de chitosane utilisées durant le procédé SCASA**

	Composition massique (%)		m <sub>t</sub> (g)
	Eau	Chit	
Susp1	99,50	0,50	502,50
Susp2	99,38	0,62	402,50
Susp3	99,38	0,62	503,14
Susp4	99,38	0,62	603,75

## 3. Solutions alcalines

Plusieurs solutions alcalines ont été préparées à base d'hydroxyde de sodium (NaOH) et d'hydroxyde de potassium (KOH) (Prolabo, France) pour recevoir et stabiliser les particules générées dans l'autoclave durant le procédé antisolvant (SAS) (Tableau 14).

**Tableau 14: Compositions des solutions alcalines de récupération durant le procédé SAS**

	Composition massique (%)		m <sub>t</sub> (g)
	sel	Eau	
R1_NaOH	2,9	97,1	51,5
R2_KOH	2,0	98,0	51
R3-KOH	1,0	99,0	50,5

## 4. Test antibactérien

Les tests antibactériens ont été réalisés sur la souche PUC18 de l'*Escherichia coli* (*E. coli*, Gram négatif). La gélose nutritive a été préparée par le mélange de 96,9% d'eau ultra-pure,

1,8% de milieu nutritif LB (Lysogeny Broth) et 1,3% d'Agar. Une étape de stérilisation aux UV de tout le matériel utilisé, des films composites et des particules a été effectuée pour éviter toute contamination. Pour tous les essais, des boîtes de pétri contenant 11 ml de gélose nutritive ont été préparées. Les protocoles adoptés sont décrits dans le chapitre IV.

## **B. Procédés de génération de particules**

### **1. Par effet Anti-solvant supercritique (SAS)**

#### **a. Montage expérimental**

Les essais ont été réalisés sur un pilote polyvalent d'extraction et de cristallisation par fluides supercritiques (Separex, France). Une représentation du pilote est donnée en Figure 39.

Le circuit est approvisionné en CO<sub>2</sub> (pureté 99,995%, Air Liquide, France) à une pression d'environ 40 bars à l'aide d'une pompe Haskel (P1) à partir de la bouteille de CO<sub>2</sub>. Le CO<sub>2</sub> est ensuite refroidi par l'échangeur (E1) et stocké à l'état liquide dans le réservoir (R). Il est mis en circulation dans le système et est comprimé par une pompe à membrane P2 (Lewa, Allemagne). Le CO<sub>2</sub> comprimé passe ensuite dans un échangeur de chaleur (E2) réglé à 40°C pour le rendre supercritique puis est injecté dans l'autoclave A de capacité de 1,2 L (PARR Instrument, États Unis).

(A) est équipé de plusieurs fenêtres en saphir, d'un agitateur magnétique de couple maximal de 1,8 N.m ainsi que d'un collier chauffant amovible.

La pression dans l'autoclave est régulée en amont via le déverseur (D). Un filtre fluide-particule (F) est placé à la sortie de l'autoclave pour empêcher les particules entraînées par le fluide de contaminer le reste du circuit.

Trois séparateurs cycloniques (S1, S2 et S3) permettent de séparer les solvants du CO<sub>2</sub> par dépressurisation progressive. La pression dans chacun des séparateurs est régulée par des vannes micrométriques.

A la sortie des séparateurs, un lit de charbon actif (CA) permet de purifier le CO<sub>2</sub> avant d'être refroidi par l'échangeur (E1) et renvoyé dans le réservoir (R).

Une pompe HPLC (P3) (Gilson, États-Unis) permet d'injecter la solution de chitosane dans l'autoclave (A) via un capillaire en acier inoxydable de diamètre de 100µm et de 10mm de longueur.

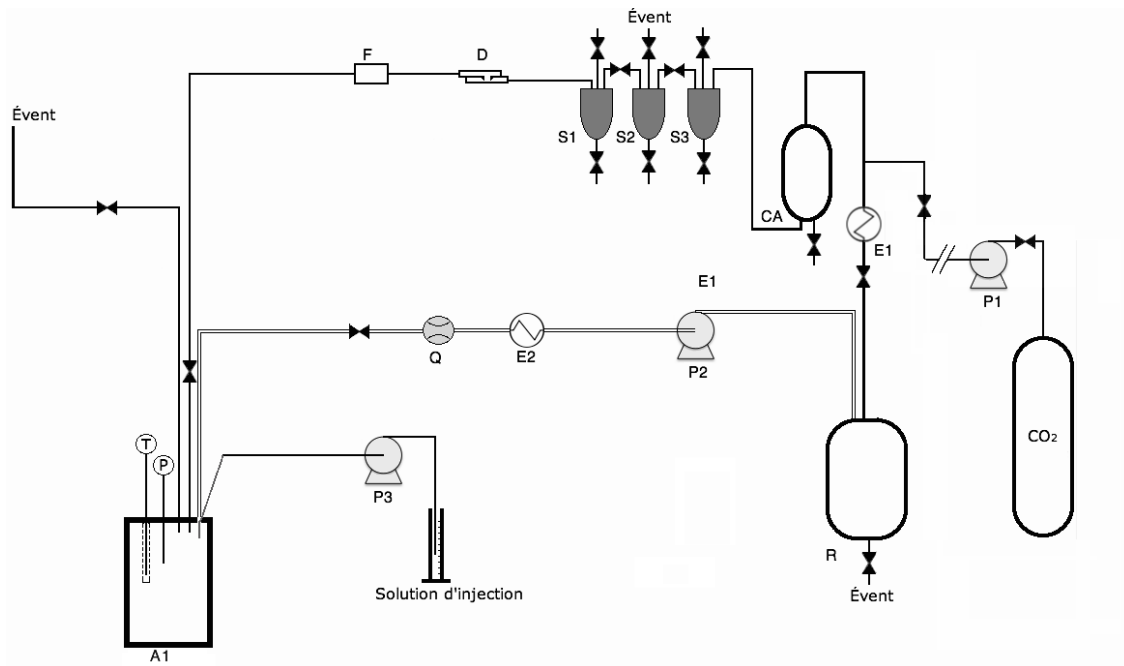


Figure 39: Représentation du pilote utilisé. S1, S2 et S3 : séparateurs cycloniques ; P1, P2 et P3 : pompes ; A1 : autoclave ; F : filtre ; E1, E2 : échangeurs thermiques ; CA : charbon actif ; D : déverseur ; Q : débitmètre ; R : réservoir de CO<sub>2</sub> liquide ; T : thermomètre ; P : manomètre.

### b. Protocole opératoire

La difficulté majeure de ce procédé est la présence dominante de l'eau dans la solution de chitosane : l'eau est très faiblement miscible avec le CO<sub>2</sub> qui doit agir comme antisolvant de l'acide acétique, solvant du chitosane. Pour essayer d'améliorer le contact et le transfert entre la solution aqueuse de chitosane et le CO<sub>2</sub>-sc, c'est la solution qui a été pulvérisée à l'aide du capillaire de diamètre réduit dans un environnement de CO<sub>2</sub>-sc préalablement établi. Les différentes configurations étudiées sont présentées et détaillées dans le Chapitre III. Les conditions opératoires ont été reproduites 3 fois, et seuls les essais ayant abouti à des résultats prometteurs sont présentés dans le Chapitre III.

A la fin de l'injection de la solution de chitosane, l'autoclave est dépressurisé à l'évent et les particules en suspension sont récupérées, lavées à l'eau déminéralisée ( $6 < \text{pH} < 7$ ), puis lyophilisées (Freeze-dryer Christ Alpha 1-4 LDC-1M, Allemagne) à 3 kPa, pour une température de congélation de  $-12^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Atomisation assistée par CO<sub>2</sub> supercritique (SCASA)

### a. Montage expérimental

Le dispositif expérimental du procédé SCASA est présenté dans la Figure 40.

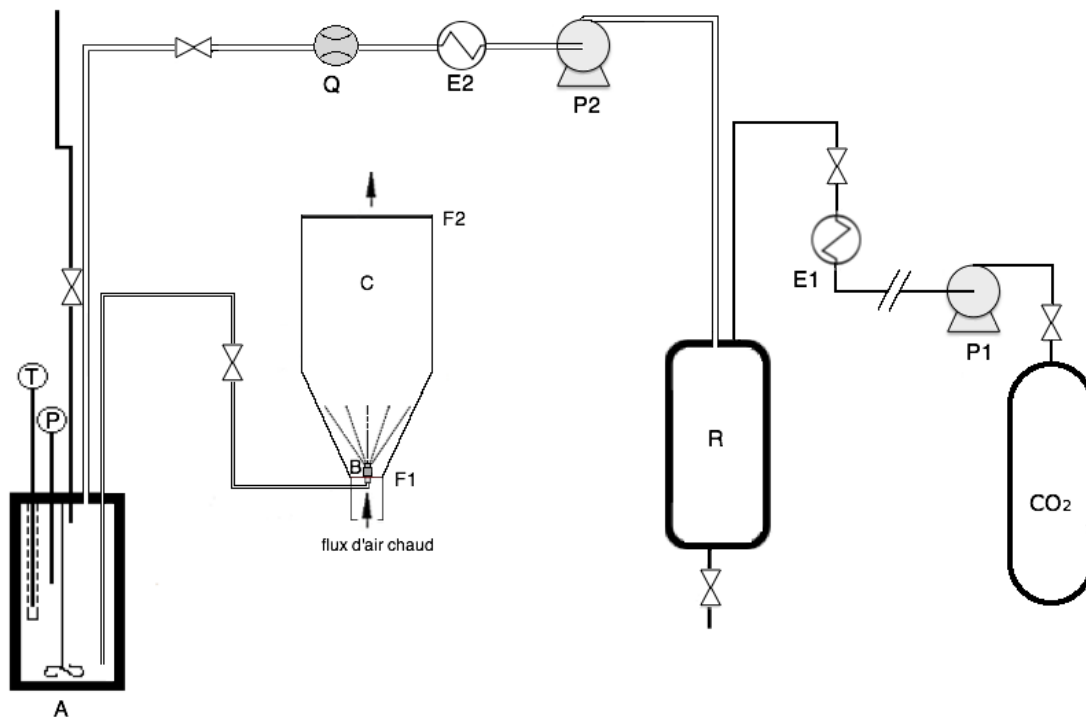


Figure 40: Schéma de principe du procédé SCASA. P1, P2 : pompes ; A1: autoclave; E1, E2 : échangeurs thermiques ; Q : débitmètre ; R : réservoir de CO<sub>2</sub> liquide ; T : thermomètre ; P : manomètre ; C : cyclone – lit d'air fluidisé ; F1 et F2 : filtres

L'introduction du CO<sub>2</sub> dans le pilote et dans l'autoclave est identique au procédé SAS. L'autoclave (A) (1,2L) est utilisé pour préparer la solution de chitosane. Un élément de pulvérisation (O) (capillaire en inox de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre interne utilisé dans le procédé SAS ou une buse de diamètre de sortie de 340 $\mu\text{m}$ ) est placé à la sortie de l'autoclave (A) et fixé à l'entrée du lit d'air fluidisé (C) (Aeromatic-Fieldler, Suisse), et agit comme outil d'atomisation. Le lit d'air fluidisé est traversé par un flux d'air chaud à vitesse et température réglables pour sécher les particules générées durant la pulvérisation. Deux filtres (F1 et F2) sont placés aux deux extrémités du lit d'air (C) pour arrêter les particules : F1 est une toile en inox qui permet une entrée homogène de l'air chaud ; F2 est constitué de quatre sacs de filtration associés à une toile fine en inox (45x45 $\mu\text{m}$ ).

### b. Protocole opératoire

Une dispersion aqueuse de chitosane en poudre est placée dans l'autoclave (A) sous agitation. Les conditions opératoires de pression et de température employées sont  $200 \pm 5$  bars et  $25 \pm 2$  °C. Dans ces conditions, 24h d'agitation continue permettent la dissolution majoritaire du chitosane. La solution de chitosane obtenue est ensuite directement envoyée par un flux continu de CO<sub>2</sub> sous pression, vers l'élément de pulvérisation (buse ou capillaire) qui est à

pression atmosphérique. Ce flux de CO<sub>2</sub>, préchauffé à 60°C, a pour but de maintenir la pression dans l'autoclave à 140±10 bars et de faciliter le séchage de la solution. Le lit d'air fluidisé est préalablement chauffé à 80 °C et la vitesse de l'air est maintenue maximale, de façon à évaporer l'eau contenue dans la solution et sécher les particules générées et éviter le contact entre la solution et les parois. La vitesse d'agitation est ajustée au cours de la pulvérisation afin de maintenir une émulsion homogène visuellement et une température constante du flux pulvérisé. Le CO<sub>2</sub> repasse naturellement sous forme gazeuse à la dépressurisation au travers de l'élément de pulvérisation. Les particules sèches sont récupérées dans les filtres (F2).

Le principe de fonctionnement de ce procédé est explicité dans le Chapitre III.

### 3. *Nébulisation/précipitation*

Le procédé de nébulisation est un procédé classique qui consiste à pulvériser à l'aide d'air comprimé, la solution acide aqueuse de chitosane dans un bain de coagulation/précipitation. Il est utilisé dans cette étude afin de comparer un procédé classique aux procédés de génération assistés par le CO<sub>2</sub> supercritique.

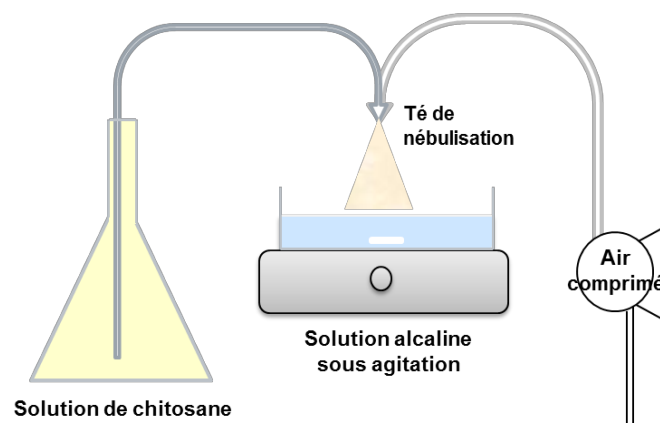


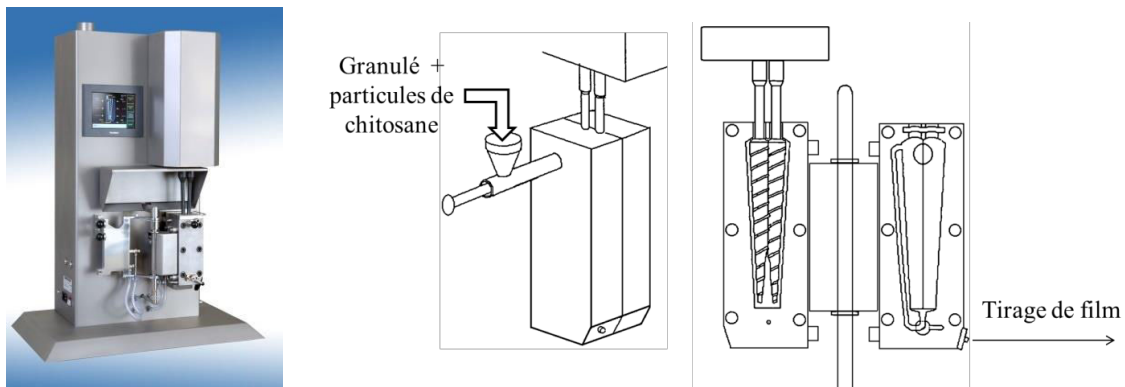
Figure 41: Illustration du procédé de nébulisation utilisé

Dans notre cas, une solution acide aqueuse (1:1 w/w) de chitosane de concentration  $C_m=0,6 \text{ g.L}^{-1}$  est préparée à température ambiante. La solution est ensuite pulvérisée à l'aide de l'air comprimé (2 bars) à travers un té de nébulisation dans une solution alcaline d'hydroxyde de sodium NaOH (1M), sous agitation continue (Figure 41). A la fin de la pulvérisation, la suspension obtenue est lavée plusieurs fois à l'eau déminéralisée puis lyophilisée (CHRIST alpha 1-2 LD plus, Allemagne) sous 3 kPa après une congélation à -12 °C.



### C. Extrusion-cast des films biocomposites

Avant la réalisation des films composites, les granulés du PLA, du PHBV ainsi que toutes les particules de chitosane ont été étuvés à 80°C pendant 16 h afin de réduire le taux d'humidité et minimiser la dégradation thermique des polyesters. La mise en œuvre par extrusion-cast a été réalisée par un microcompounder bivis co-rotatives de 15 cm<sup>3</sup> de capacité, muni d'une conduite de recirculation de la matière, (DSM Xplore micro-compounder, Geleen, Pays-Bas) présenté sur la Figure 42, en utilisant une filière plate. Suite à plusieurs essais préliminaires, une température uniforme de 180°C, une vitesse de rotation de vis de 70 tr.min<sup>-1</sup> et un temps de séjour de la matière de 5 minutes ont été retenus pour le PLA (170°C, 40 tr.min<sup>-1</sup> et 5 minutes pour le PHBV), afin d'éviter la dégradation thermique du matériau tout en permettant un bon mélangeage. Des films composites ont été préparés en utilisant 12 g de PLA (ou PHBV) avec 0, 2,4 et 10 % en masse de particules de chitosane, et ce pour les trois types de particules (commercial, nébulisé et généré par procédé supercritique). Dans le cas des composites à base de PHBV, seuls les composites contenant 2,4% des trois charges, et 10% de charge commerciale ont pu être extrudés. En effet, selon la nature et le taux de charge utilisés, une influence significative sur la rhéologie du polyester peut être observée suite à la dégradation du matériau expliqué par la présence de ces charges [143]. Cette dégradation engendre une augmentation de la fluidité du matériau et empêche la mise en œuvre des composites.



**Figure 42:** Image du microcompounder bivis co-rotatives DSM Xplore microcompounder (gauche) et de la mise en œuvre (droite)

Les films obtenus ont été ensuite conditionnés à température ambiante. Les épaisseurs des films ont été mesurées en utilisant un pied à coulisse (Digimatic, Mitutoyo, Angleterre) avec une précision de  $\pm 0,01$  mm ; elles sont toutes comprises entre 100 et 250  $\mu\text{m}$ . Dans la suite, les noms suivants seront adoptés pour identifier les films: «PLA Pur», «PLA:Com-x », «PLA:Nebu-x », «PLA:Nano-x », où Com, Nebu et Nano désignent respectivement les

chitosanes commercial, nébulisé et généré par le procédé supercritique et x représente le taux de charge dans le composite. Une démarche similaire est utilisée pour le PHBV.

### **III. Protocoles analytiques et caractérisations des particules et des films biocomposites**

#### **A. Analyse de la morphologie et de la granulométrie des particules et des films biocomposites**

##### **1. Granulométrie et distribution de taille**

Deux techniques ont été utilisées pour déterminer la distribution de taille des particules : une en voie sèche par analyse d'images et une en voie liquide en utilisant la granulométrie laser.

##### **a. Granulométrie en voie sèche**

Des clichés des différentes particules de chitosane sèches ont été pris par microscopie électronique à balayage : pour les particules générées par le procédé SAS, c'est un microscope électronique à balayage (MEB) environnemental (ESEM XL30 FEG, FEI Philips, Pays-Bas) qui a été utilisé. Pour les particules commerciales, nébulisées et générées par le procédé SCASA, c'est un MEB environnemental (Quanta 200 FEG, FEI, Pays-bas) associé à un module de microanalyse de type Silicon Drift Detector (SDD) X-Max<sup>N</sup> 80 mm (Oxford) qui a été utilisé.

Dans le cas où les particules ont été observées et pour chaque type de particules, la taille de 500 particules prises d'au moins quatre images a été déterminée à l'aide du logiciel de traitement d'image ImageJ afin de déterminer le diamètre moyen des particules et la distribution de taille des particules pondérée en nombre.

##### **b. Granulométrie en voie liquide**

La distribution de taille des particules en suspension générées par le procédé SAS (avant le lavage et la lyophilisation) ainsi que le potentiel zêta de la suspension ont été mesurés par l'évaluation du spectre de la diffusion dynamique de la lumière à l'aide d'un Zetasizer nano (Malvern Instruments, France). Pour les particules générées par le procédé SCASA, une analyse a été effectuée par l'évaluation du spectre de diffraction de lumière en utilisant un appareil 2000HS Mastersizer (Malvern Instruments, France) et l'éthanol comme agent de dispersion.

Les échantillons des films composites ont été plongés dans le chloroforme, pendant 24h pour s'assurer d'une parfaite dissolution du PLA. Une granulométrie en voie liquide en utilisant le diffractomètre Laser LS 13 320 MW équipé d'un module de sonication (Beckman Coulter, France) a été réalisée afin de comparer la taille des particules avant et après la mise en forme pour évaluer l'effet du procédé d'extrusion sur la taille des charges de chitosane.

## **2. Aspect et dispersion des charges dans les matrices**

La microscopie optique a été utilisée pour observer l'aspect et la dispersion des particules de chitosane dans les films biocomposites après extrusion. Les clichés ont été réalisés à l'aide d'un microscope optique (Leitz Laborlux 11 POL, Leitz, Allemagne) équipé d'une caméra numérique CCD (résolution 1600\*1200 pixels) et d'un logiciel d'acquisition et de traitement d'image Archimed (Microvision Instruments, France). Les films étant relativement épais pour permettre l'obtention de clichés avec un seul plan de particules, un petit échantillon de chaque matériau a été déposé sur une lame en verre préalablement chauffée ; à l'aide d'une lamelle fine, l'échantillon fondu est aplati afin d'obtenir une fine couche de biocomposite facilement observable au microscope.

De plus, des coupes au microtome ont été réalisées à l'université de Montpellier II sur des joncs composites extrudés par le même procédé de mélangeage et observées au MEB environnemental Quanta 200 FEG, afin d'examiner la répartition des particules dans la matrice biopolyester.

## **B. Analyse macromoléculaire**

Deux méthodes de détermination de masse moléculaire du chitosane commercial ont été utilisées : la première par une approche viscosimétrique, ne donnant qu'un ordre de grandeur approximatif de la masse moléculaire en viscosité  $M_v$  ; la deuxième est une approche plus précise par la chromatographie à perméation de gel (GPC) et qui donne accès à la masse moléculaire en nombre  $M_n$  et en poids  $M_w$ . Seuls le PLA en granulés et ses composites ont été analysés durant cette étude et uniquement par GPC.

De plus, certaines propriétés des solutions de chitosane ont été analysées telles que la densité, la viscosité et la tension de surface.

### **1. Masse moléculaire viscosimétrique**

La viscosité des solutions de chitosane a été déterminée à l'aide d'un rhéomètre rotatif (RheoStress 600, Thermo Scientific, États-Unis) en utilisant une géométrie plan-plan de

diamètre 60 mm en mode continu sur une plage de taux de cisaillement comprise entre 0 et 500 s<sup>-1</sup> à 25°C.

A partir des mesures de viscosité, il est possible d'avoir une estimation rapide de la masse moléculaire viscosimétrique  $M_v$  du chitosane en utilisant la loi de Mark-Houwink Sakurada (MHS) [36] :

$$[\eta_{int}] = K * M_v^a \quad \text{eq. 1}$$

Avec  $[\eta_{int}]$  la viscosité intrinsèque,  $K$  et  $a$  les constantes pour le système polymère/solvant,  $K$  et  $a$  ont été estimés par Rao *et al.* (1993) à  $4,74 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$  et 0,72 respectivement [144].

Une première étape consiste à évaluer les viscosités intermédiaires (relative  $\eta_{rel}$  et spécifique  $\eta_{sp}$ ) pour plusieurs concentrations de solutions de chitosane (Tableau 15) afin d'en déduire la viscosité intrinsèque  $[\eta_{int}]$  à l'aide de la relation de Huggins :

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} \quad \text{et} \quad \eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \quad \text{eq. 2}$$

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = K'[\eta_{int}]^2 * C + [\eta_{int}] \quad \text{eq. 3}$$

$\eta_0$  et  $\eta$  sont respectivement les viscosités dynamiques du solvant seul et de la solution de chitosane,  $K'$  est la constante de Huggins et  $C$  la concentration des solutions de chitosane.

**Tableau 15: Composition massique et viscosités dynamiques des solutions de chitosane utilisées pour la détermination de la masse moléculaire viscosimétrique  $M_v$**

Composition massique (%)				Viscosité (mPa.s)
Eau	Ac Ac	Chit	$m_t$ (g)	
90,90	9,10	0	22	1,2
89,89	8,99	1,12	22,25	31,3
88,89	8,89	2,22	22,5	114,3
87,91	8,79	3,30	22,75	258,6

Dans la relation de Huggins (eq. 3),  $[\eta_{int}]$  est l'ordonnée à l'origine de la droite  $(\eta_{sp}/C) = f(C)$  et sa valeur a été trouvée d'environ  $0,13 \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ . Cette relation est spécifiquement applicable à de très faibles concentrations avec  $[\eta_{int}] * C \ll 1$  [145]. L'extrapolation de cette équation au-delà de cette limite a induit une valeur maximale de  $[\eta_{int}] * C$  de 4,5 pour les concentrations testées, qui est considéré comme acceptable. Par conséquent, la masse moléculaire calculée par la loi MHS (eq. 1) à partir de la loi de Huggins est de 62 kDa.

## **2. Masse moléculaire par chromatographie par perméation de gel**

La détermination de la masse moléculaire du chitosane commercial, des granules de PLA ainsi que de certains films composites à base de PLA a été réalisée par GPC. Cette analyse a pour but de :

- 1) Déterminer la masse moléculaire du chitosane commercial d'une manière fiable et évaluer l'analyse par la méthode viscosimétrique.
- 2) Observer l'effet des charges de chitosane et du procédé de mise en œuvre sur la longueur des chaînes moléculaires du PLA.

Pour la mesure de la masse moléculaire du chitosane commercial, le protocole utilisé par l'IMP de Lyon est le suivant : 1 mg de chitosane commercial est solubilisé dans 1 ml d'une solution tampon d'acétate (0,2M en acide acétique et 0,15M en acétate d'ammonium), sous agitation pendant 1 nuit à 22°C. La solution est ensuite filtrée à l'aide d'une membrane cellulosique de 0,45µm de porosité. 100µl de la solution filtrée est injecté et analysé. L'appareil utilisé est composé d'un dégazeur (VWR), d'une pompe Argilent1260 Infinity à débit fixe de 0,5ml.min<sup>-1</sup>, d'un injecteur automatique Waters 717 plus, d'un détecteur MALLS, d'un réfractomètre thermostaté à 25°C et dont  $\lambda=658$  nm ainsi que de 2 colonnes Tosh (TSK PW 2500 et TSK PW 6000). Les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel ASTRA 6.

La mesure des masses moléculaires du PLA et ses composites a été réalisée par GPC à l'ICGM (Institut Charles Gerhardt de Montpellier) après dissolution du PLA au THF et filtration du solide. L'appareil utilisé est un VARIAN 390 LC-multidetector muni d'une pompe à un débit de 1 ml.min<sup>-1</sup>. La calibration s'est fait au polystyrène.

## **3. Densité, viscosité et tension de surface**

La tension de surface et la densité ont été déterminées à l'aide d'un tensiomètre ILMS (GBX instruments, France) par la méthode de la lame de Wilhelmy et par la méthode du flotteur calibré respectivement. Les viscosités ont été déterminées par la méthode décrite précédemment. Les valeurs sont présentées dans le Tableau 16.

Tableau 16: Propriétés de différentes solutions de chitosane

Composition massique (%)				m <sub>t</sub> (g)	Viscosité (mPa.s)	Tension de surface (mN.m <sup>-1</sup> )	Densité
Eau	EtOH	Ac Ac	Chit				
100	0	0	0	20	1	71,76	1
97,6	0	2,4	0	41	1,2	57,76	1,006
96,4	0	2,4	1,2	41,5	25,3	60,5	1,04
87,9	0	11	1,1	45,5	n.d	46,94	1,02
49,7	49,7	0,6	0	80,5	3,1	28,8	0,91
49,4	49,4	0,6	0,6	81	22,9	31,57	0,94
49,1	49,1	1,2	0,6	81,5	22,5	30,05	0,93
55,6	47,1	1,4	1,4	72	54,9	32,83	0,95

### C. Analyse de la stabilité thermique et de la cristallisation

Toutes les analyses de ce paragraphe ont été reproduites deux fois et les résultats qui sont annoncés dans le chapitre IV sont les valeurs moyennes de ces deux analyses.

#### 1. Thermogravimétrie (ATG)

L'analyse thermogravimétrique (ATG) est utilisée pour évaluer la stabilité et la dégradation thermiques des matériaux biocomposites à base de charges de chitosane dans le biopolyester (PLA ou PHBV) et déterminer l'effet de la taille des charges. L'appareillage utilisé pour les mesures est un analyseur thermogravimétrique Pyris 1 TGA de PerkinElmer Instruments (Etats-Unis). Chaque échantillon de masse comprise entre 8 et 12 mg est placé dans une nacelle en céramique qui est ensuite introduite dans le four chauffant. La perte de masse est enregistrée en fonction de la température ascendante. Les essais sont réalisés pour une plage de température de 25 à 800°C et pour une vitesse de chauffe de 10°C/min dans un flux d'azote gazeux de 20ml.min<sup>-1</sup>.

#### 2. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

L'analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC) permet de déterminer les échanges thermiques d'un matériau par rapport à une référence afin d'examiner les transitions thermiques comme la fusion, la transition vitreuse, la cristallisation... Le principe consiste à placer dans les cellules de mesure deux enceintes identiques, une contenant le matériau à analyser et l'autre de référence (vide dans notre cas), sous un programme de température donné et atmosphère contrôlée, et d'enregistrer la puissance nécessaire pour maintenir une différence de température nulle entre elles, sous atmosphère contrôlée. Des échantillons de chaque film de masse comprise entre 8 et 15 mg ont été placés dans des creusets en aluminium fermés par des couvercles percés puis sertis et analysés. L'appareillage et le profil

de températures utilisés ont été sélectionnés en fonction de l'étude menée. Quatre études ont été réalisées : une étude classique anisotherme linéaire de chauffe-refroidissement, une étude cinétique isothermique, une étude en DSC modulée (profil sinusoïdal de température) et en StepScan (plateau de température) pour découpler les phénomènes cinétiques des phénomènes thermodynamiques. Les études anisothermique, isothermique et *StepScan* ont été réalisées en utilisant l'appareil Pyris Diamond DSC de PerkinElmer Instruments, couplé à un système de refroidissement qui permet de contrôler le refroidissement dans le four. Pour la DSC modulée en température, c'est un appareil Q200 de chez TA instrument.

#### a. Etude en DSC classique : anisotherme linéaire

Les essais ont été réalisés sous un flux constant de  $20 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  d'azote. La première montée en température montre le comportement du matériau face au changement de température ainsi que l'effet du procédé sur le matériau. Après la 1<sup>ère</sup> montée, l'histoire thermique du matériau est effacée ; une 2<sup>ème</sup> montée permettra alors de déterminer le comportement du matériau sans l'effet du procédé. Le programme de température utilisé est le suivant : une montée en température de  $30^\circ\text{C}$  à  $180^\circ\text{C}$  pour le PLA ( $200^\circ\text{C}$  pour le PHBV) à une vitesse de chauffe de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , puis une descente jusqu'à  $30^\circ\text{C}$  suivi d'une deuxième montée jusqu'à  $180^\circ\text{C}$  ( $200^\circ\text{C}$  pour le PHBV) à la même vitesse (Figure 43).

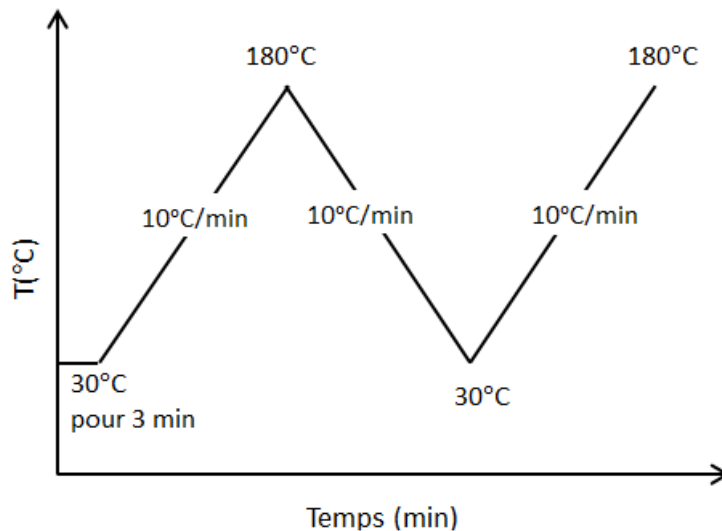


Figure 43: Profil de température utilisé en DSC classique anisotherme linéaire pour les composites à base de PLA

En utilisant un tel programme de température, il est possible de déterminer la transition vitreuse  $T_g$ , la température de cristallisation  $T_c$  (température de cristallisation froide  $T_{cc}$  dans le

cas du PLA), l'enthalpie de cristallisation  $\Delta H_c$  ( $\Delta H_{cc}$  pour le PLA), la température de fusion  $T_f$  et l'enthalpie de fusion  $\Delta H_f$ . Il est ainsi possible de déterminer le taux de cristallinité final  $\chi_{cf}$ .

$$\chi_{cf} = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^0 * (p_{biopolyester})} * 100 \quad \text{eq. 4}$$

Où  $\Delta H_f$  est l'enthalpie de fusion du polymère,  $p_{biopolyester}$  est la fraction massique du polymère et  $\Delta H_f^0$  est l'enthalpie de fusion du polymère 100% cristallin. Les valeurs de  $\Delta H_f^0$  sont 93 J.g<sup>-1</sup> pour le PLA [146] et 146 J.g<sup>-1</sup> pour le PHBV [105].

Il faut noter que cette équation prend en compte, dans le cas du PLA, la fusion de tous les cristaux, ceux déjà présents dans le matériau après extrusion ainsi que ceux formés lors de la cristallisation froide. Pour déterminer le taux de cristallinité initial du matériau après extrusion  $\chi_{c0}$ , il est nécessaire de soustraire la cristallinité froide mesurable à l'aide de l'enthalpie de cristallisation froide pendant la phase de chauffe  $\Delta H_{cc}$ , en utilisant la relation suivante :

$$\chi_{c0} = \frac{\Delta H_f - \Delta H_{cc}}{\Delta H_f^0 * (p_{biopolyester})} * 100 \quad \text{eq. 5}$$

### **b. Etude en DSC modulée en température et step-scan**

Cette technique a été utilisée en complément de la DSC classique anisotherme. Durant l'analyse de certains mélanges de polymères, des interférences entre les transitions thermiques peuvent avoir lieu et des pics peuvent en cacher d'autres [105,147]. En utilisant la DSC modulée en température ou la StepScan, il est possible d'améliorer l'analyse en séparant les flux thermiques liés aux phénomènes thermodynamiques réversibles des flux liés aux phénomènes cinétiques irréversibles.

#### *i. StepScan*

Le profil de température appliqué durant cette méthode de mesure est constitué de cycles répétitifs d'une séquence de chauffe courte suivie d'un plateau isotherme ce qui permet de mesurer la capacité thermique  $C_p$  qui reflète les aspects réversibles rapides du matériau. Les effets cinétiques irréversibles lents ne sont pris en compte dans l'enregistrement du  $C_p$  qui seront représentés sur la courbe Iso-K (signal irréversible).

Durant cette étude, un premier cycle de chauffe-refroidissement a été réalisé afin de supprimer l'histoire thermique du matériau. Ensuite, une rampe de température jusqu'à 135°C pour le PLA (150°C pour le PHBV) est appliquée et suivie de l'analyse en StepScan. L'analyse est a été réalisée autour du pic de fusion du biopolyester (entre 135°C et 181°C



pour le PLA et entre 150°C et 200°C pour le PHBV) avec des cycles répétitifs composés d'une séquence de chauffe courte de 1 minute à une vitesse de 2°C.min<sup>-1</sup> et d'un plateau isotherme pendant 1 minute (Figure 44).

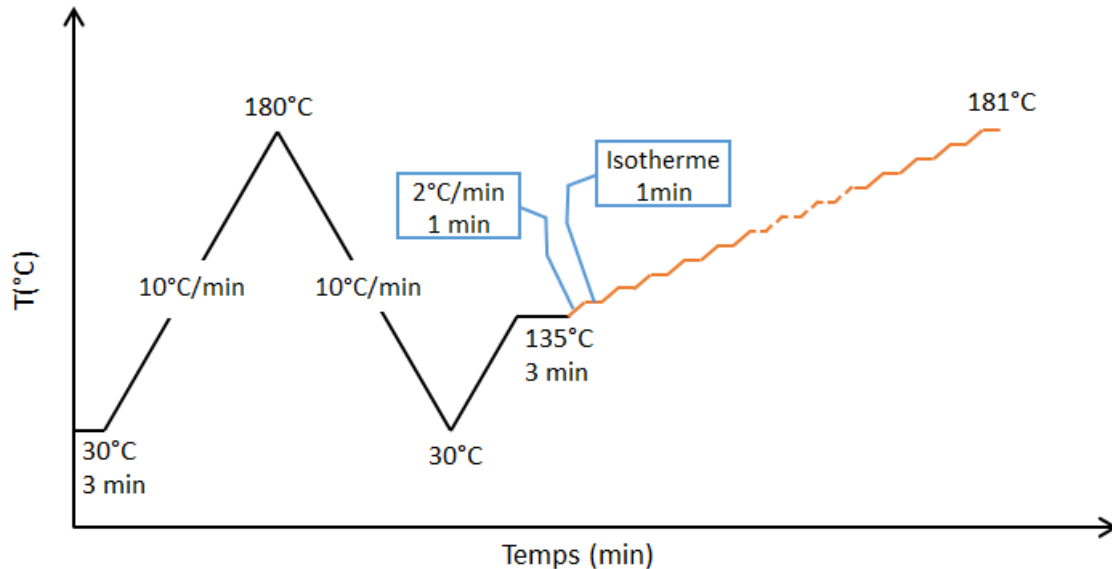


Figure 44: Profil de température utilisé en *StepScan* pour les composites à base de PLA

Après l'enregistrement des valeurs, un traitement à l'aide du logiciel *Pyris StepScan* a permis de décomposer la courbe  $C_p$  de la courbe Iso-K de chacun des matériaux.

#### ii. DSC modulée en température (TMDSC)

Le principe de la TMDSC est similaire à celui du *StepScan*. La différence réside dans le profil de température imposé. Dans la TMDSC, on impose un profil de température sinusoïdal selon une période et une amplitude données autour d'une programmation linéaire. Trois signaux sont obtenus : le flux total (total Heat flow), correspondant au signal obtenu en DSC classique, le flux lié au  $C_p$  réversible (*reversing HF*) et le flux irréversible lié à la cinétique de chauffe (*non reversing HF*).

Les essais ont été réalisés sous un flux d'azote « sec » de 50 ml.min<sup>-1</sup> et pour une plage de température allant de -10°C à 200°C avec une rampe de 2°C.min<sup>-1</sup>. La méthode *Heat Only* a été utilisée durant l'enregistrement où la sinusoïde appliquée passe uniquement par une chauffe autour de la programmation en température linéaire de 2°C.min<sup>-1</sup>. De ce fait, c'est l'appareil qui choisit l'amplitude en fonction de la vitesse de chauffe linéaire et de la période : une période de 60 secondes a été retenue ce qui engendre une amplitude de 0,32°C (Figure 45).

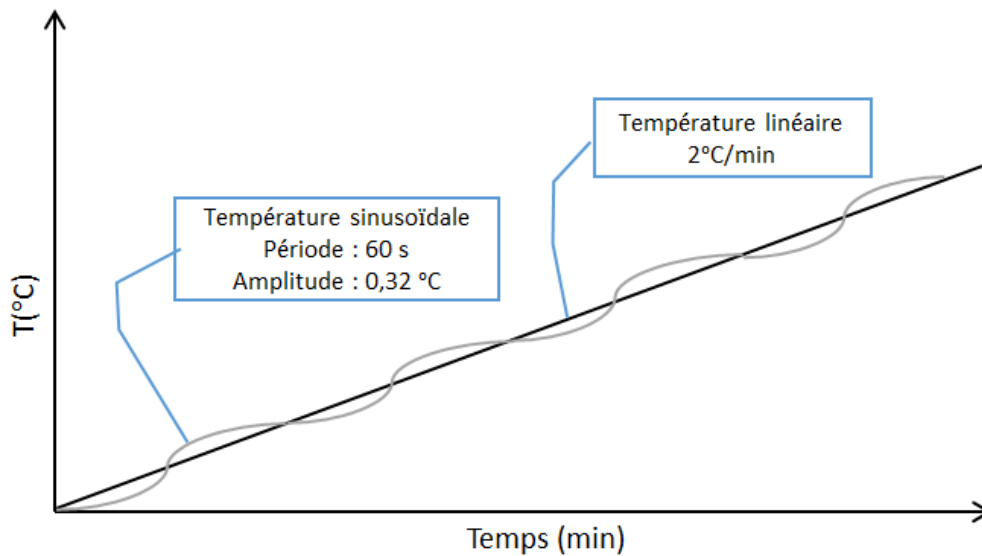


Figure 45: Profil de température utilisé durant la TMDSC

### c. Etude cinétique isothermique

Cette étude a pour but d'essayer d'expliquer certains phénomènes qui ont été observés par l'étude anisotherme classique. La cinétique de cristallisation a été évaluée en partant de l'état fondu du matériau. Durant tous les essais, les échantillons ont été chauffés à  $200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  jusqu'à  $200^{\circ}\text{C}$  et maintenus durant 3 minutes à cette température afin d'effacer l'histoire thermique du matériau. Ensuite, pour atteindre la température de l'isotherme, une étape de refroidissement rapide à la même vitesse de  $200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  est nécessaire afin d'éviter la cristallisation pendant le refroidissement. En appliquant cette démarche, plusieurs isothermes ont été étudiés (Figure 46) dans la zone du pic de cristallisation froide :  $108^{\circ}\text{C}$ ,  $110^{\circ}\text{C}$ ,  $112^{\circ}\text{C}$ ,  $118^{\circ}\text{C}$ ,  $120^{\circ}\text{C}$ ,  $122^{\circ}\text{C}$ ,  $128^{\circ}\text{C}$ ,  $130^{\circ}\text{C}$  et  $132^{\circ}\text{C}$ .

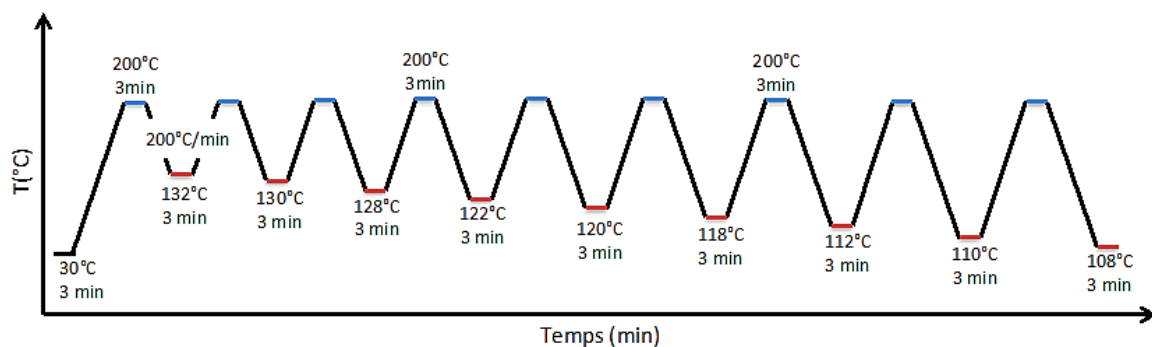


Figure 46: Profil de température utilisé durant l'étude cinétique pour les composites à base de PLA

L'étude de la cinétique de cristallisation a été effectuée en se basant sur la théorie d'Avrami.

La théorie d'Avrami permet de décrire les changements des phases à l'intérieur d'un solide à une température constante. Les taux de transformations suivent en général une sigmoïde où la vitesse de cristallisation est faible au départ dans la phase de germination, et qui augmente significativement pendant la phase de croissance pour revenir à une valeur faible dans la phase de terminaison où les cristaux commencent à se toucher, ce qui constitue une barrière et une fin à leur croissance.

Afin de déterminer les vitesses de cristallisation, les aires des pics exothermiques enregistrés doivent être calculées en fonction du temps  $t$ .  $\alpha(t)$  représente la fraction volumique transformée en cristaux à un instant  $t$ . Il peut être calculé en divisant l'aire partielle du pic calculée entre le temps 0 et un instant  $t$  par l'aire totale du pic de cristallisation.

$$\alpha(t) = \frac{A_{i(t)}}{A_{totale}} \quad \text{eq. 6}$$

Le coefficient  $\alpha(t)$  permet aussi de déterminer le coefficient d'Avrami  $n$  et la constante de vitesse de la transformation isotherme  $k$  par la relation suivante :

$$\alpha(t) = 1 - \exp(-kt^n) \quad \text{eq. 7}$$

En linéarisant cette expression, on obtient des droites dont  $n$  est le coefficient directeur et  $\ln(k)$  est l'ordonnée à l'origine.

$$\ln[-\ln(1 - \alpha(t))] = \ln(k) + n * \ln(t) \quad \text{eq. 8}$$

Un paramètre important pour décrire la cinétique de cristallisation est le temps de demi-réaction  $t_{1/2}$  pour lequel la transformation cristalline est à 50%. Il est lié à la constante de vitesse  $k$  par la relation suivante :

$$k = \frac{\ln(2)}{t_{1/2}^n} \quad \text{eq. 9}$$

## D. Analyse structurale

### 1. Cristallinité par diffractométrie de rayons X (DRX)

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'influence du procédé de génération des particules de chitosane sur sa structure cristalline. La structure cristalline des différentes poudres de chitosane a été étudiée par diffractométrie de rayons X (DRX) à l'aide d'un diffractomètre Brücker AXS (Allemagne), modèle D8 Advance. La radiation utilisée est  $K_{\alpha, Cu}$  ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ).

L'analyse a été réalisée entre 5° et 60° (2 $\theta$ ), sous une tension de 40 kV et une intensité de 40 mA avec un pas d'angle de 0,007°.

## 2. Degré d'acétylation (DA)

Le degré d'acétylation du chitosane commercial a été déterminé par 2 méthodes différentes : une méthode précise (mais couteuse !) qui est la résonance magnétique nucléaire (RMN) et une méthode moins précise mais qui propose un bon compromis entre la précision et la simplicité qui est la spectroscopie infrarouge.

### a. Par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Cette analyse n'a été effectuée que sur le chitosane commercial (à l'IMP de Lyon). Le protocole utilisé est le suivant : 10mg de chitosane ont été dissous dans 1 ml d'oxyde de deutérium (D<sub>2</sub>O) et 5 $\mu$ l de l'acide chlorhydrique HCl (à 37%), sous agitation continue pendant 1 nuit. L'appareillage utilisé est un spectromètre Brücker Avance III 400 MHz équipé d'une sonde de mesure de 5mm BBFO ATMA avec un gradient de champs z.

### b. Par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

Cette technique de mesure est moins fiable que la RMN mais elle est de loin la plus facile et la plus utilisée. Dans notre cas, elle est uniquement utilisée afin d'observer qualitativement l'influence du procédé de génération des particules de chitosane sur son degré d'acétylation (DA).

Le principe de ce type de mesure consiste à trouver un rapport entre deux pics d'absorption spécifiques, un relatif à la teneur en fonction acétyle et l'autre invariable selon le DA, qui permet d'illustrer le changement de structure chimique dû à une différence d'acétylation. Plusieurs corrélations ont été établies et utilisées dans la littérature durant d'autres études sur le chitosane [31,148,149]. Ces corrélations ont été testées sur les chitosanes commerciaux et générés et parmi les corrélations une seule s'est avérée adaptée en fournissant des résultats cohérents [31] :

$$DA = 31,92 * (A_{1320}/A_{1420}) - 12,20 \quad \text{eq. 10}$$

Où  $A_{1320}$  et  $A_{1420}$  sont les absorbances du pic à 1320  $\text{cm}^{-1}$  lié aux fonctions O-H, -C-O et amines acétylées/amides et du pic à 1420  $\text{cm}^{-1}$  relatif à la déformation des liaisons -C-H. Ce dernier s'est révélé pratiquement inchangé pour différents degrés d'acétylation connus et, par conséquent, a été choisi comme pic de référence.

Le degré d'acétylation a été déterminé par spectroscopie infrarouge sur un spectromètre à transformée de Fourier FTIR Brüker IFS 66 5700 (Brüker Optics, Allemagne) pour une gamme spectrale comprise entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution de  $4\text{cm}^{-1}$  et un balayage de 32 sur des échantillons de 3 à 5 mg. L'analyse des différents matériaux, préalablement étuvés, a été réalisée par monoréflexion totale atténuée (ATR) en utilisant le module PLATINUM ATR (Brüker, Allemagne).

## E. Analyse des propriétés viscoélastiques et thermomécaniques

### 1. Par analyse mécanique dynamique (DMA)

L'appareillage utilisé pour cette étude est un analyseur dynamique mécanique DMA system 50N (01dB-Mettravib, France) équipé d'un four. L'analyse a été réalisée en mode cisaillement (plus adapté pour les films) (Figure 47), à une fréquence constante de 10 Hz et pour un déplacement fixé à 10  $\mu\text{m}$  pour des températures allant de 25°C à 160°C à une vitesse de  $3^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Les échantillons analysés sont sous forme de films, découpés dans la longueur la plus homogène en épaisseur du film extrudé, de dimensions 20 x 15 x  $0,19 \pm 0,01$  mm.

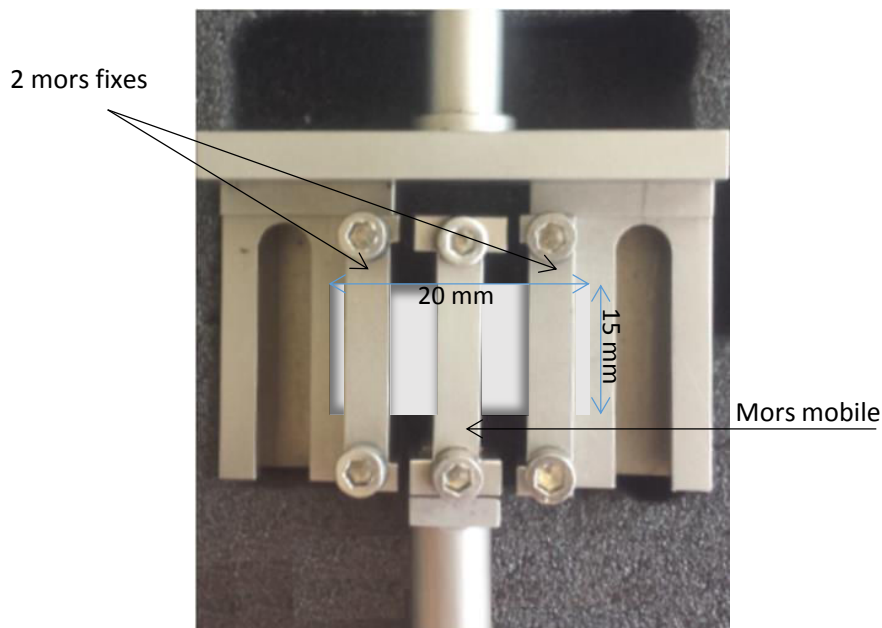


Figure 47: Image de l'essai mécanique en cisaillement par la DMA

L'analyse n'a pas pu être réalisée sur les films de PHBV en raison de leur mauvaise planéité films. En effet, à cause de la fluidité de la matière lors de l'extrusion-*cast* réalisée avec le microcompoundeur, il n'a pas été possible d'obtenir des films plats avec une épaisseur homogène ; il n'était donc pas rigoureux de prélever des échantillons de ces films ondulés

pour faire les analyses en DMA. Il serait judicieux d'envisager un nouveau grade de PHBV, mieux adapté à l'extrusion-*cast*, et qui permettrait ainsi une analyse plus précise et correcte.



# **CHAPITRE III.**

## **GENERATION DE NANOPARTICULES DE CHITOSANE PAR DES PROCÉDÉS ASSISTÉS PAR CO<sub>2</sub> SUPERCRITIQUE**

Dans ce chapitre, nous allons étudier l'influence des conditions de procédés assistés par CO<sub>2</sub>-sc sur la génération de particules de chitosane. Le CO<sub>2</sub>-sc est utilisé à la fois pour ses propriétés physico-chimiques et pour son pouvoir de «pulvérisation». Dans un premier temps, nous allons commencer par l'étude du procédé par effet anti-solvant (SAS) en s'intéressant à l'effet de certains paramètres (la composition de la solution de chitosane et la concentration de la solution basique de récupération) sur la génération des particules de chitosane. Dans un deuxième temps, le développement d'un procédé d'atomisation et de solubilisation assistées par CO<sub>2</sub>-sc (SCASA) sera décrit. Les montages expérimentaux utilisés pour ces procédés ainsi que les matériaux ont été décrits dans le Chapitre II.



# I. Etude des conditions de procédés de génération de particules de chitosane

## A. Procédé par effet anti-solvant supercritique – SAS

### 1. Principe de l'effet anti-solvant appliqué au cas du chitosane

Le procédé anti-solvant consiste à ajouter à une solution de chitosane, un fluide dans lequel il n'est pas soluble (le CO<sub>2</sub>-sc), mais dans lequel le solvant (l'eau acidifiée), l'est. Ceci provoque une sursaturation dans la solution provoquant la cristallisation du soluté sous forme solide : en effet, lors de la mise en contact de la solution avec l'anti-solvant supercritique, deux transferts de masse ont lieu simultanément : la dissolution du CO<sub>2</sub>-sc dans la solution accompagnée d'une expansion importante de volume provoquant une réduction du pouvoir solvant, et l'évaporation du solvant dans la phase supercritique entraînant une augmentation de la concentration du soluté ; ces deux phénomènes provoquent une sursaturation rapide du soluté induisant sa cristallisation. L'efficacité de ce procédé repose alors sur une miscibilité suffisante de l'anti-solvant avec le solvant du polymère. Dans le cas d'une solution habituelle de chitosane à base d'acide acétique très dilué dans l'eau, cette condition de miscibilité n'est pas satisfaite dû à la très faible miscibilité du CO<sub>2</sub> dans l'eau (solubilité de 2,6%mol de CO<sub>2</sub> à 35°C entre 15 et 20 MPa [150]). Cette miscibilité insuffisante altère l'effet anti-solvant, raison pour laquelle ce procédé n'a pas été utilisé auparavant pour la génération des particules de chitosane.

Dans ces travaux, nous avons étudié ce procédé afin de l'adapter aux solutions de chitosane, en jouant en particulier sur le contact entre la solution et le CO<sub>2</sub>-sc et sur la composition des solutions présentes.

### 2. Essais préliminaires

Selon Rinaudo *et al.* (1999), le chitosane subit une solubilisation totale dans l'acide acétique pour un rapport [AcOH]/[Chit-NH<sub>2</sub>] = 0,6 [151]. En tenant compte de la nécessité d'une faible viscosité de la solution pour pouvoir l'injecter à travers le capillaire impliquant des faibles concentrations de chitosane, la proportion d'acide acétique dans la solution devient dans ce cas très faible ; ceci n'est pas favorable pour l'effet anti-solvant.

La solution de chitosane a alors été préparée avec un excès d'acide acétique (sol1 dans le Tableau 12) pour favoriser le contact entre le CO<sub>2</sub>-sc et la solution. Ces essais préalables ont pour but d'évaluer l'effet anti-solvant dans cette condition.

Seule une partie du pilote décrit dans le Chapitre II est utilisée comme le montre la Figure 48 (SAS batch).

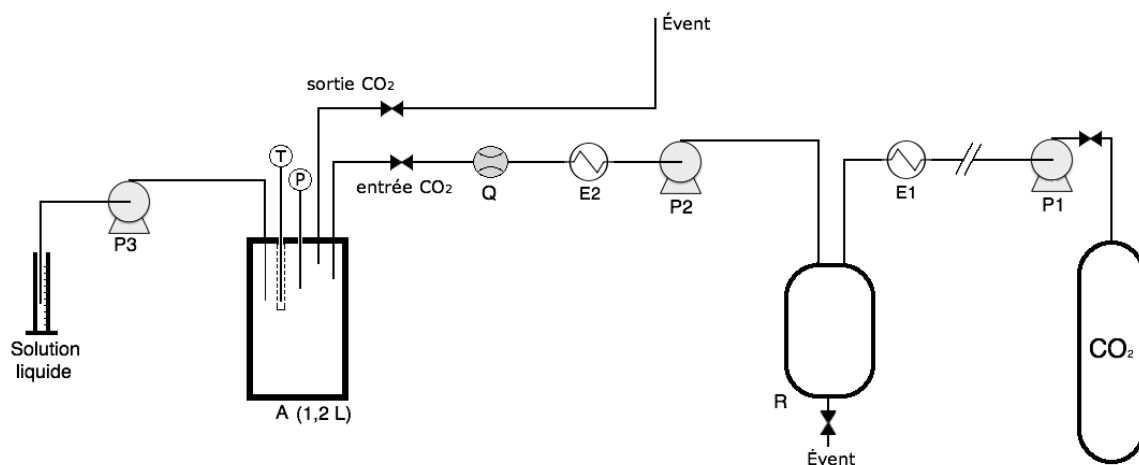


Figure 48: Schéma de principe du procédé SAS en batch. P1, P2 et P3 : pompe ; A : autoclave ; Q : débitmètre ; E1 et E2 : échangeurs thermiques ; R : réservoir de CO<sub>2</sub> liquide.

Le CO<sub>2</sub>-sc est introduit en premier dans l'autoclave A, sous pression. Une fois que le système a atteint son état d'équilibre en pression et en température, dans notre cas  $17 \pm 0,5$  MPa et  $35 \pm 5^\circ\text{C}$  respectivement, la solution sol1 est injectée à  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  à travers un capillaire en inox de 10 mm de longueur et 100  $\mu\text{m}$  de diamètre dans l'autoclave pendant 15 minutes.

Après dépressurisation, une solution limpide a été récupérée au fond de l'autoclave dont le pH était de 2,38 dû à la présence résiduelle d'acide acétique qui n'a pas été évacué par le CO<sub>2</sub>. Dans ces conditions de forte acidité, les nuclei de chitosane sont dissous et ne peuvent pas croître pour générer des particules solides. Dans cette configuration, le procédé anti-solvant est donc inefficace.

Afin de générer des particules de chitosane par un procédé SAS, il était nécessaire d'apporter des modifications au niveau du fonctionnement du procédé, ainsi qu'au niveau des solutions utilisées.

### **3. Optimisation du procédé SAS pour la génération de particules de chitosane**

Quatre modifications ont été apportées au procédé initial : trois concernent la composition des solutions mis en jeu et une liée au montage.

#### **a. Optimisation du ratio acide acétique/chitosane**

En raison de l'acidité résiduelle de la solution récupérée lors des essais préliminaires, il a été tout d'abord nécessaire de réduire la quantité d'acide acétique utilisée. En appliquant une "marge de sécurité" par rapport à la condition de stœchiométrie (pour compenser les éventuels problèmes d'accessibilité lors de l'hydratation du polymère), le chitosane a été dissous dans une solution contenant un "léger excès" d'acide acétique. Dans la suite des expériences, nous avons adopté un ratio [AcAc]/[Chitosane] de 1 ou 2, au lieu de 10, dans le cas du 1<sup>er</sup> essai préliminaire.

#### **b. Renforcement de la miscibilité entre la solution de chitosane et le CO<sub>2</sub>-sc par ajout d'éthanol**

Pour compenser la réduction de la quantité d'acide acétique, l'éthanol qui est parfaitement miscible avec l'acide acétique et avec le CO<sub>2</sub> à haute pression, est ajouté à la solution de chitosane pour renforcer l'effet anti-solvant : il diminue significativement la tension superficielle de la solution et facilite le transfert réciproque des solvants dans le CO<sub>2</sub>-sc (Tableau 16).

Cet effet a été confirmé visuellement par l'expansion volumique des gouttelettes de solution injectée (non présentée) marquant le meilleur transfert du CO<sub>2</sub> dans la solution. La présence de l'éthanol devrait ainsi favoriser le transfert et l'élimination des solvants et ainsi la génération des particules.

#### **c. Nouvelle configuration : SAS en mode semi-continu**

Le procédé a été modifié afin de favoriser le contact entre la solution de chitosane et le CO<sub>2</sub>-sc et d'éliminer davantage l'acide acétique (Figure 39). De la même façon que dans le SAS en batch, le CO<sub>2</sub>-sc est introduit dans un premier temps seul dans l'autoclave. Ensuite, il circule en circuit fermé dans le but de stabiliser les pressions et les débits dans tout le système avant l'injection de la solution de chitosane. Les différentes pressions sont régulées par le déverseur et les vannes micrométriques (Tableau 17). Lorsque le régime stationnaire est atteint, deux capillaires coaxiaux permettent la co-injection, à débit fixe, de la solution de chitosane (à

l'intérieur) et du CO<sub>2</sub>-sc (à l'extérieur) dans l'autoclave, dans le but de renforcer les transferts entre les différentes phases.

**Tableau 17: Conditions de pression et de température des différents essais du procédé SAS en « semi-continu »**

T <sub>A</sub> (°C)	P <sub>A</sub> (MPa)	P <sub>S1</sub> (MPa)	P <sub>S2</sub> (MPa)	P <sub>S3</sub> (MPa)
35 ± 5	17,5 ± 0,5	7,8 ± 1	7,1 ± 0,9	4,5 ± 0,5

De plus, des séparateurs sont placés à la sortie de l'autoclave pour recycler le CO<sub>2</sub> chargé de solvants avant sa réintroduction dans l'autoclave. La pression de CO<sub>2</sub> est réajustée régulièrement pour compenser la perte de charge lors des purges, les éventuelles fuites et la chute de pression due à la dissolution du CO<sub>2</sub> dans la solution de chitosane.

Ce montage sera adopté pour tous les essais réalisés par effet anti-solvant.

Néanmoins, malgré la réduction de la quantité d'acide acétique (Sol3 dans le Tableau 12) dans la solution de chitosane et malgré le renforcement de l'effet anti-solvant par le changement du procédé et l'ajout de l'éthanol, le pH du milieu de récupération égal à 4,6 demeure toujours trop acide pour conserver des particules solides de chitosane (pH < pK<sub>a</sub> du chitosane).

En effet, l'acidité de la solution finale récupérée dans l'autoclave peut provenir de :

- 1) la présence d'acide acétique résiduel dans l'autoclave qui n'a pas été dissous dans le CO<sub>2</sub>-sc et évacué, ceci probablement dû à la présence d'eau dans la solution de chitosane, faiblement miscible avec le CO<sub>2</sub> ;
- 2) la solubilisation du CO<sub>2</sub> dans l'eau, certes non suffisante pour un effet anti-solvant mais qui peut également engendrer la formation d'acide carbonique H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, qui induit théoriquement un pH de 3 [152].

Cette acidité a pu provoquer la dissolution de particules de chitosane préalablement formées ce qui explique leur absence.

Pour obtenir des particules solides, il s'avère donc indispensable d'ajouter une solution de récupération dans l'autoclave de précipitation qui permet de neutraliser l'acidité excédentaire dans le milieu de récupération final des particules.

#### d. Neutralisation de l'acidité résiduelle par une solution basique dans l'autoclave de précipitation

En respectant les modifications apportées précédemment, une solution basique a été préalablement placée dans l'autoclave dans le but de recevoir les particules éventuellement générées par effet anti-solvant et d'éviter leur dissolution, en neutralisant l'acidité résiduelle lors de la précipitation des particules. La basicité de la solution de récupération a été choisie telle que le pH final après injection soit supérieur au pK<sub>a</sub> du chitosane de 6,3.

Le Tableau 18 présente les différentes conditions opératoires testées. Pour tous ces essais, la solution de chitosane Sol3 (pH=4,9) a été utilisée.

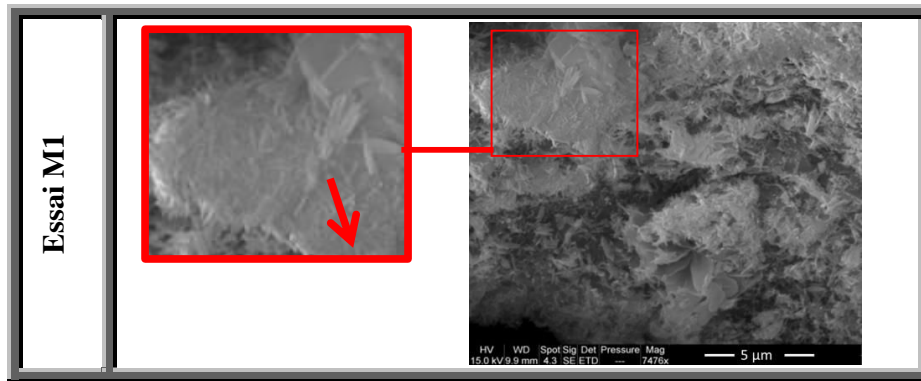
**Tableau 18: Conditions d'essais pour les expérimentations réalisées par le procédé SAS en mode semi-continu**

Essai	Paramètres d'injection		Solution de récupération		
	Q <sub>inj</sub> (g.min <sup>-1</sup> )	Q <sub>CO2</sub> (g.min <sup>-1</sup> )	Type	pH <sub>i</sub>	pH <sub>f</sub>
M1	0,89	69	R1_NaOH	13,4	7,3
M2	0,88	99	R2_KOH	13,5	7,9
M3	0,89	87	R3_KOH	13,3	6,3
M4	0,92	86	R2_KOH	13,6	7,1
M5	0,87	86	R3_KOH	13,1	7,1

#### 4. Résultats obtenus suite aux modifications apportées au procédé SAS

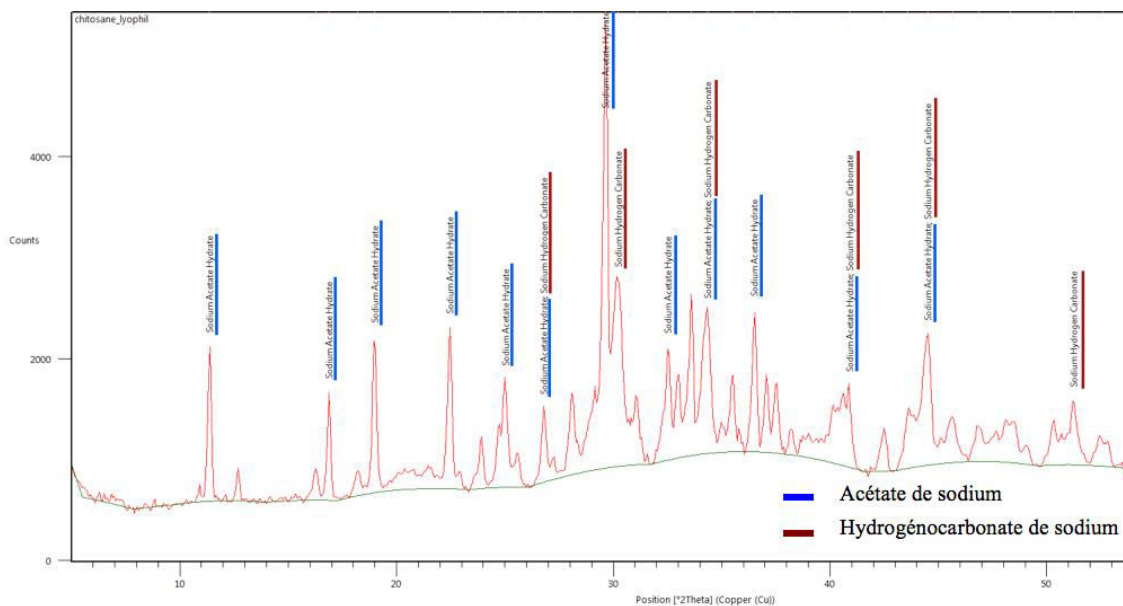
##### a. Effet de la solution de récupération sur les particules de chitosane générées

Une première solution testée est l'hydroxyde de sodium NaOH de pH initial à 13,4 (Tableau 14), qui a permis l'augmentation du pH final du milieu de récupération jusqu'à 7,3 (essai M1), alors qu'il n'était que de 4,6 en absence de solution de récupération. Dans ce milieu de récupération, des filaments en suspension ont été observés. Après lyophilisation, l'observation MEB montre la présence d'une couche de cristaux à la surface des particules (Figure 49).



**Figure 49: Cliché MEB des filaments obtenus lors de l'utilisation d'une solution de récupération à base de NaOH après lyophilisation**

Une analyse DRX a permis de déterminer la nature de ces cristaux (Figure 50) : le contact de l'hydroxyde de sodium NaOH avec le CO<sub>2</sub> et l'acide acétique CH<sub>3</sub>COOH provoque la précipitation de cristaux de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – qui engendrent en présence d'eau et de CO<sub>2</sub> des hydrogénocarbonates de sodium NaHCO<sub>3</sub> – et d'acétate de sodium CH<sub>3</sub>COONa respectivement. Il était alors impossible d'analyser les particules dans cet état, ce qui a rendu nécessaire leur lavage avant la lyophilisation.



**Figure 50: Diffractogramme des particules obtenues lors de l'essai M2 après lyophilisation**

Afin d'éliminer ces sels, une phase de lavage à l'eau est indispensable. Pour réduire le nombre de cycles de lavage, la solution d'hydroxyde de sodium est remplacée par l'hydroxyde de potassium (KOH) : la solubilité des sels de potassium dans l'eau est plus élevée que celle de sels de sodium, ce qui réduit la quantité de sel dans la suspension et rend l'étape de lavage

plus aisée. À titre d'exemple, à 20°C, la solubilité de l'hydrogénocarbonate de potassium est de 322 g.L<sup>-1</sup> alors qu'elle n'est que de 87 g.L<sup>-1</sup> pour l'hydrogénocarbonate de sodium.

Grâce aux améliorations précédemment décrites, des particules ont finalement pu être observées pour les essais M2 à M5. Les essais M2 et M3 diffèrent par la concentration de la solution de récupération de KOH. Les résultats de ces deux essais sont présentés sur les images MEB (Figure 51) et comparés aux particules commerciales (Figure 51a) : pour l'essai M2 (Figure 51b), des particules sphériques micrométriques et submicroniques sont observées dans un réseau poreux de chitosane composé de particules ultrafines. L'essai M3 produit des nanoparticules et microparticules sphériques mieux définies sans réseau poreux (Figure 51c). Ces résultats confirment la capacité du procédé SAS à générer des particules de chitosane.

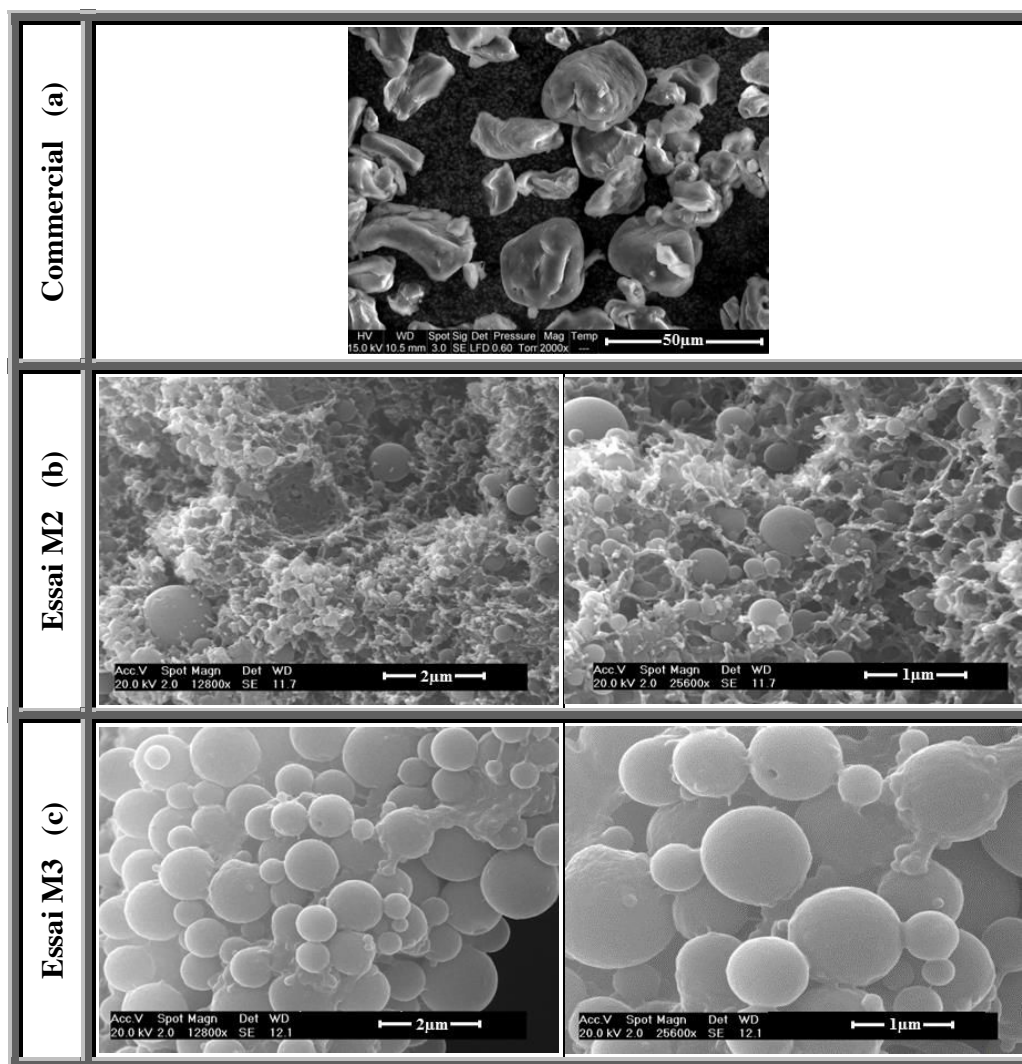


Figure 51: Clichés MEB des particules de chitosane commercial (a) et générées par le procédé SAS : essai M2, particules sphériques de chitosane dans un réseau poreux (b) et essai M3, particules sphériques de chitosane bien individualisées (c)

Ces deux différentes morphologies générées, i.e. les particules intégrées dans un réseau poreux de chitosane et les particules de chitosane bien individualisées, pourraient s'expliquer par la coexistence de deux principaux phénomènes de génération de solide (Figure 52) :

- 1) la génération de particules individuelles par l'effet anti-solvant du CO<sub>2</sub>-sc à la sortie du capillaire (Figure 52a).
- 2) la génération du réseau poreux par décomposition spinodale qui est d'une part due à la transition de pH, ce qui induit une instabilité thermodynamique de la solution engendrant une séparation de phases [153] ainsi que la coagulation de particules lors du contact de la solution de chitosane avec la solution alcaline, et d'autre part à la désorption du CO<sub>2</sub> (Figure 52b, configuration A).

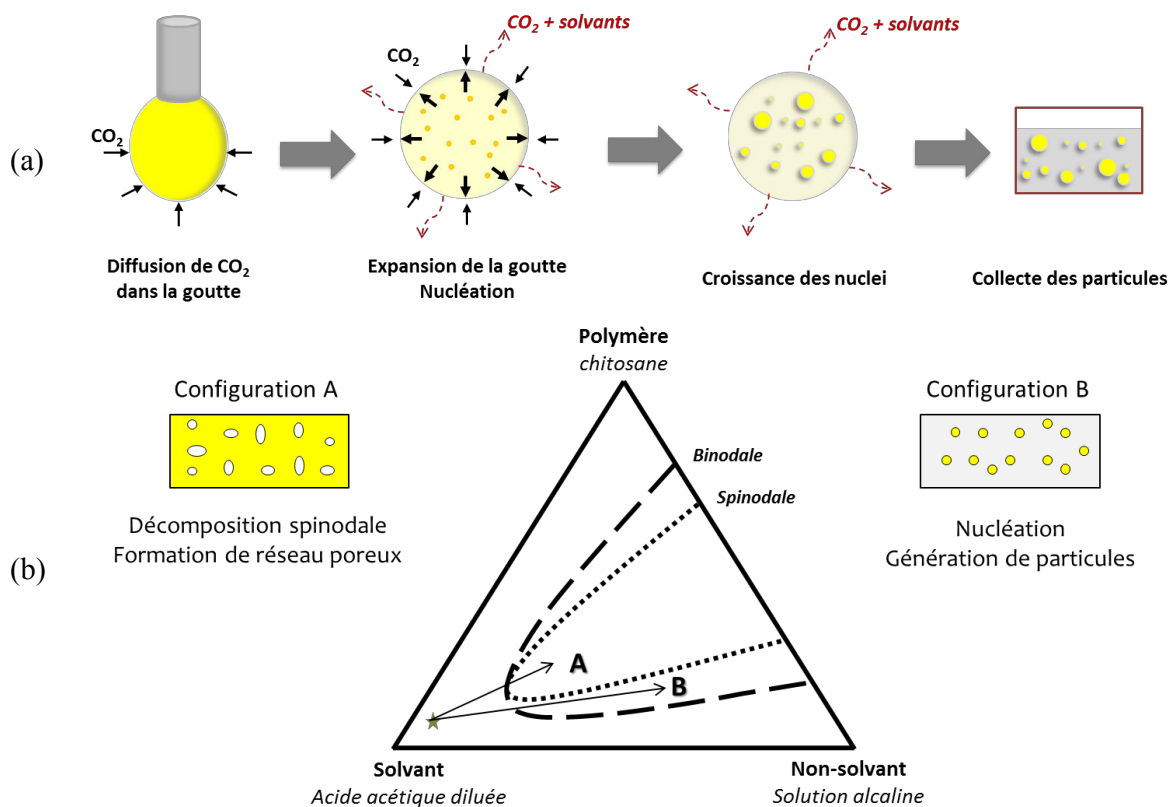


Figure 52: Schéma représentant les mécanismes de génération de particules par effet anti-solvant (a) et de séparation de phase (b) durant le procédé SAS [154]

Ces deux phénomènes concurrents peuvent considérablement varier localement, même pour de petites variations de pH; en effet, c'est principalement le pH final de la solution de récupération qui diffère entre les expériences M2 et M3.

Les essais M4 et M5 sont une reproduction des essais M2 et M3 respectivement, pour tester la répétabilité du procédé SAS : malgré le respect du protocole opératoire, les pH finaux des



solutions de récupération et les morphologies des solides générés sont significativement distincts (Figure 53).

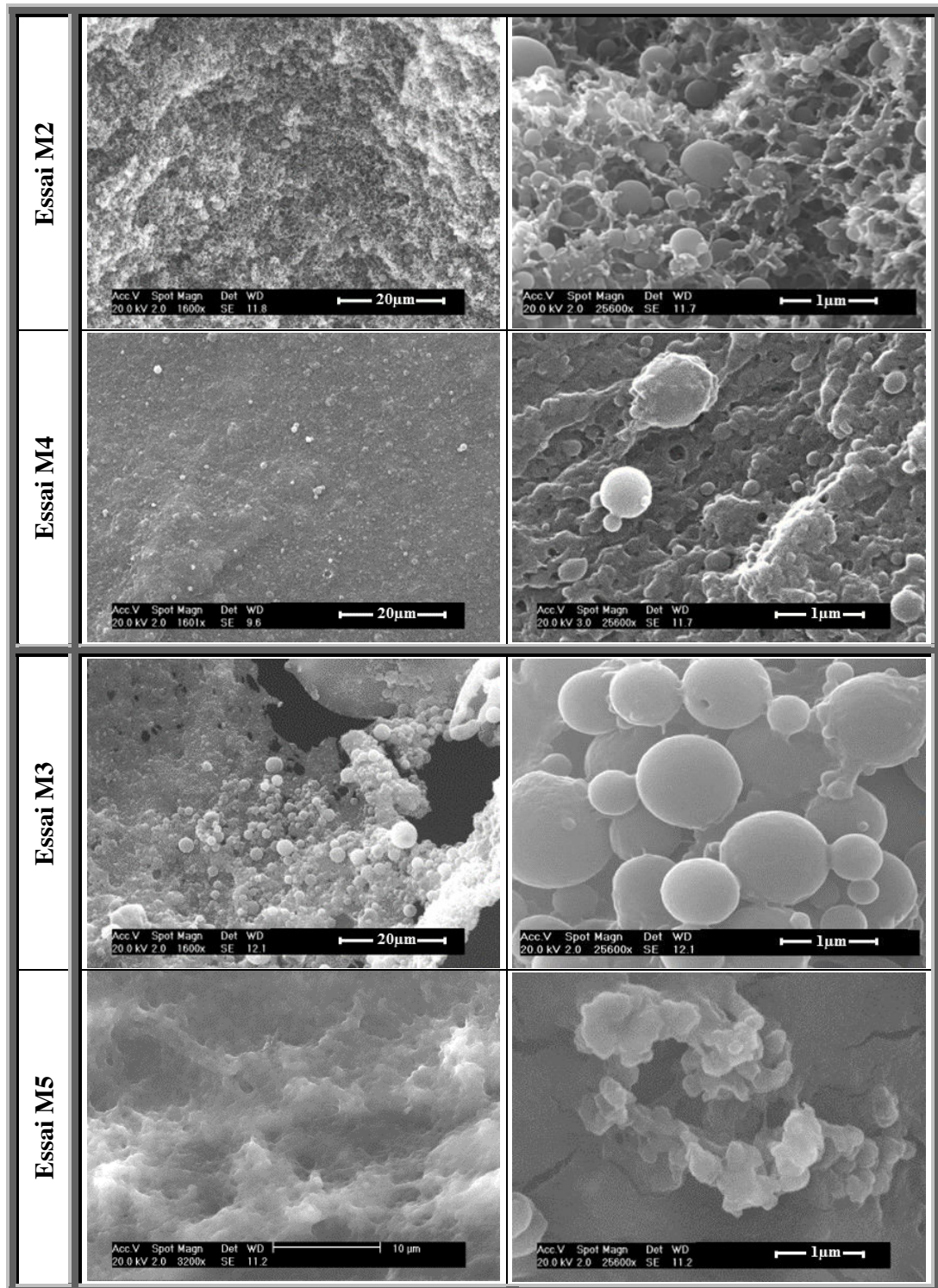


Figure 53 : Clichés MEB des particules de chitosane générées par le procédé SAS montrant un manque de reproductibilité du procédé (M2 vs M4 et M3 vs M5)

Ces résultats montrent un manque de stabilité des particules générées dû à une dissolution partielle et une agglomération dans le milieu de récupération. La forte influence de la chimie et de la physico-chimie des systèmes impliqués, en particulier le pH qui évolue au cours du procédé, sur la stabilité des particules se traduit par des contraintes opératoires pour le procédé SAS : quand le pH est en dessous du pK<sub>a</sub> du chitosane, une dissolution du chitosane a lieu ; lorsque le milieu est très basique, une agglomération des particules et une formation d'un réseau sont observées. Ceci rend la gamme opératoire du pH très réduite, alors que celui-ci est difficilement contrôlable sous pression.

### **b. Effet de la concentration du chitosane sur les particules générées**

L'effet de la concentration de chitosane a aussi été testé (Sol2 et Sol4). Les morphologies obtenues n'étaient cependant pas significativement différentes. Un point à remarquer est l'augmentation de la viscosité des solutions avec la concentration en chitosane (Tableau 16), ce qui engendre une difficulté de transfert entre la solution et le CO<sub>2</sub>-sc et réduit l'effet anti-solvant. Lorsque la solution devient très visqueuse, la pompe utilisée ne permet plus son injection dans le milieu supercritique, ce qui est aussi considéré comme une contrainte du procédé.

### **c. Comparaison des résultats aux résultats obtenus dans la littérature**

Comme les procédés SAA [128] et SAA-HCM [34] décrit dans le chapitre I, le procédé SAS développé dans ces travaux a permis la génération de fines particules sphériques de chitosane à partir d'une solution aqueuse d'acide acétique. Toutefois, les procédés utilisés pour obtenir des particules sèches sont différents: les procédés SAA et SAA-HCM ont permis la génération de particules sèches en utilisant le CO<sub>2</sub>-sc comme agent d'expansion accompagné d'un séchage par un flux d'azote à haute température ; le procédé SAS a permis la génération de particules solides dispersées dans une solution de récupération qui doit être séchée par la suite. La nécessité d'un post-traitement et les difficultés de contrôle des paramètres physico-chimiques au cours du procédé SAS ont pu induire le manque de reproductibilité observé.

Une alternative au procédé SAA, SAA-HCM et SAS a donc été développée pour générer les particules de chitosane: le procédé SCASA, pour lequel le procédé de génération a été simplifié dans le but d'obtenir des particules solides stables.

## **B. Procédé d'atomisation et de solubilisation assistées par CO<sub>2</sub>-sc (SCASA)**

L'objectif initial de ce procédé était de supprimer certains composants organiques afin de simplifier la physico-chimie du système. L'idée clé ici est de remplacer l'acide acétique dissous dans la solution initiale et nécessaire à la solubilisation du chitosane par le CO<sub>2</sub> dissous. L'avantage apporté par l'acidification par du CO<sub>2</sub> dissous sera sa capacité à se désorber aisément de la solution lors de la dépressurisation.

### **1. Principe du procédé : une acidification due à la dissolution du CO<sub>2</sub> dans l'eau**

La dissolution et la mise sous pression de CO<sub>2</sub> de la suspension aqueuse de chitosane provoque la dissolution du chitosane dans l'eau grâce au pouvoir acidifiant du CO<sub>2</sub> (acide carbonique). Comme nous l'avons signalé précédemment, selon une étude réalisée par Diamond et Akinfiyev (2003) [150], la limite de solubilité du CO<sub>2</sub> dans l'eau à 20 MPa et 35°C est de 2,6% (mol/mol). Dans les mêmes conditions de température et de pression, une valeur de pH de 2,95 de l'eau acidifiée a été déterminée en utilisant le modèle de Peng et *al.* (2013) [152]; elle vaut 3,26 à 110°C et 20 MPa. Ces valeurs sont en cohérence avec les mesures réalisées par Read (1975) [155]. La pression et la température de l'autoclave ont été choisies en conséquence (25±2°C et 20±0,5 MPa). Dans ces conditions, on obtient une émulsion instable de deux phases : une phase lourde de solution aqueuse de chitosane (majoritairement dissous) saturée en CO<sub>2</sub> et une phase légère de CO<sub>2</sub>-sc saturé en eau. Le séchage à l'air chaud durant la phase de pulvérisation a été renforcé par un flux continu de CO<sub>2</sub> préchauffé, afin d'accélérer le séchage des particules avant leur contact avec les parois. Directement après la dépressurisation, le pH de la solution résiduelle dans l'autoclave a été mesuré autour de 5 ce qui confirme l'acidification de l'eau par le CO<sub>2</sub> sous pression. Les particules ainsi récupérées sont sèches et exemptes de toute trace d'agent organique quel qu'il soit.

### **2. Optimisation des conditions du procédé**

Différentes suspensions de chitosane, de concentrations et de volumes différents, ont été testées en utilisant le procédé SCASA (Tableau 13). De plus, l'influence de l'outil de pulvérisation et de sa position dans le lit d'air fluidisé sur la génération des particules de chitosane a été évaluée (Tableau 19).

**Tableau 19: Paramètres opératoires des différents essais réalisés par le procédé SCASA**

Essai	Suspension	Outil de pulvérisation			Rendement en génération de solide (%)
		Type	Position	Diamètre	
M'1	Susp1	Buse	2	sortie: 340 µm	Non évalué
M'2	Susp1	Capillaire	1	interne: 100 µm	21,4
M'3	Susp2	Capillaire	2	interne: 100 µm	25,5
M'4	Susp3	Capillaire	2	interne: 100 µm	22,4
M'5	Susp4	Capillaire	2	interne: 100 µm	33,4

Le rendement indiqué dans le Tableau 19 représente le rapport entre la masse des particules de chitosane générées et récupérées et la masse du chitosane solide introduit initialement dans l'autoclave. Il faut noter qu'une quantité de suspension restent au fond de l'autoclave à la fin de l'expérience (moins de 20% de la suspension introduite). On notera également que le dispositif de collecte de particules (F2) n'est pas encore optimal et doit être amélioré : en effet, les plus fines particules nanométriques dont la taille est inférieure au maillage du filtre F2 peuvent être perdues à l'évent. Ceci explique la relative faiblesse des rendements mesurés.

L'utilisation d'une buse (essai M'1) engendre un débit de pulvérisation trop élevé par rapport au débit d'air de séchage : un dépôt humide de la solution pulvérisée a été observé sur la paroi du lit d'air fluidisé et un film sec a été finalement recueilli avec quelques particules à sa surface (Figure 54a).

La buse a ensuite été remplacée par un capillaire, ce qui a permis de réduire considérablement le débit de pulvérisation et deux cas ont été considérés en ce qui concerne l'emplacement du capillaire. Tout d'abord, le capillaire a été placé au milieu de la colonne d'air (position 1) et orienté contre le courant (essai M'2) afin d'avoir une plus longue trajectoire des particules dans l'air chaud avant d'atteindre les filtres et ainsi un meilleur séchage: un dépôt de film et des particules de chitosane ont été observés. Le dépôt de film est dû à la pulvérisation qui, à cet emplacement de capillaire, était très proche de la paroi inférieure de la colonne ; le contact a eu lieu avant que le séchage ne soit terminé. Les particules de chitosane ont été collectées au niveau des filtres F2. Comme le montre la Figure 54b, ces particules sont sphériques ; certaines d'entre elles semblent être creuses, ce qui pourrait s'expliquer par la désorption du CO<sub>2</sub> au cours de la solidification des sphères de chitosane.

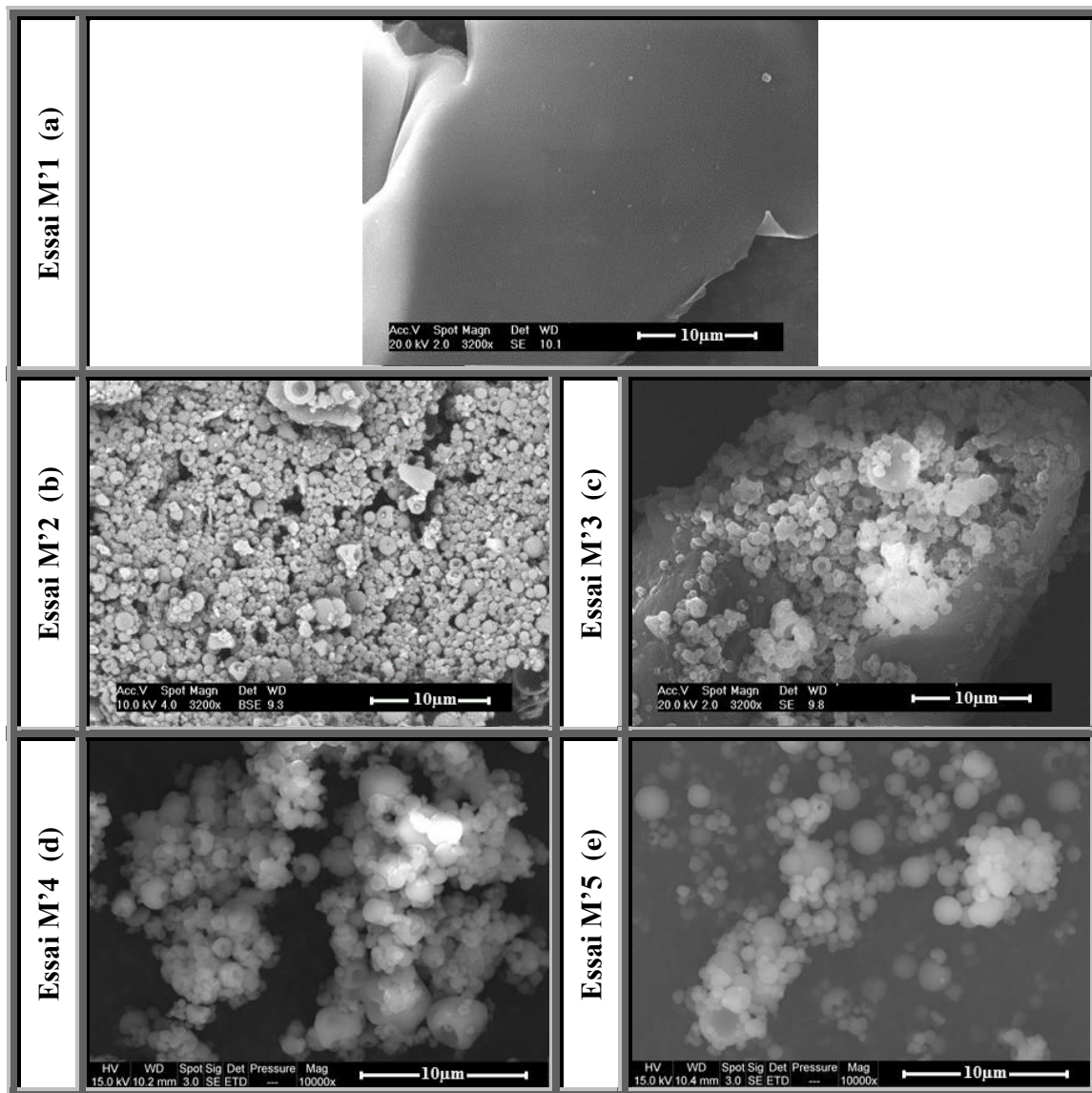


Figure 54: Clichés MEB des particules de chitosane générées par le procédé SCASA : essais M'1 (a) M'2 (b), M'3 (c), M'4 (d) and M'5 (e)

Ensuite, lorsque le capillaire a été placé en bas de la colonne d'air, orienté vers le haut dans le sens du courant d'air (position 2) (essais M'3, M'4, M'5), le dépôt de film sur la paroi est devenu négligeable par rapport à la configuration précédente et le rendement du procédé en particules solides a été généralement amélioré. La variation de la concentration de chitosane de 0,5% à 0,62% (essais M'2 et M'3 respectivement), ainsi que le volume de la solution initiale (M'3 à M'5) ne semble pas affecter de manière significative la génération de particules ni leur taille (Figure 54 b/c et c/d/e). Dans tous les cas, la distribution de taille des particules est relativement large comme on le verra dans le paragraphe suivant portant sur la caractérisation des particules générées.

## **II. Influence des procédés de génération sur les propriétés des particules de chitosane**

Dans cette partie, nous allons présenter les propriétés des différentes particules générées par les trois procédés adoptés (SAS, SCASA et nébulisation) en comparaison avec les particules de chitosane commercial: une caractérisation de la morphologie, de la granulométrie, de la structure cristalline, du taux d'acétylation ainsi que les propriétés thermiques seront exposées.

### **A. La morphologie et la granulométrie des particules de chitosane**

La Figure 55 présente les morphologies particulières générées par les différents procédés ainsi que les particules de chitosane commercial.

En utilisant le procédé SAS, deux différentes morphologies ont été observées en fonction de la concentration de la solution alcaline utilisée: dans le cas de la solution de KOH à 2% mass, des particules nanométriques sphériques et denses ont été repérées dans un réseau poreux de chitosane (Figure 55c). Le diamètre moyen de ces particules en suspension est de  $378 \pm 13$  nm, alors que la solution de KOH la moins concentrée (1% mass) a conduit à des nanoparticules sphériques mieux définies (Figure 55b) avec un diamètre moyen en suspension dans l'éthanol de  $820 \pm 19$  nm.

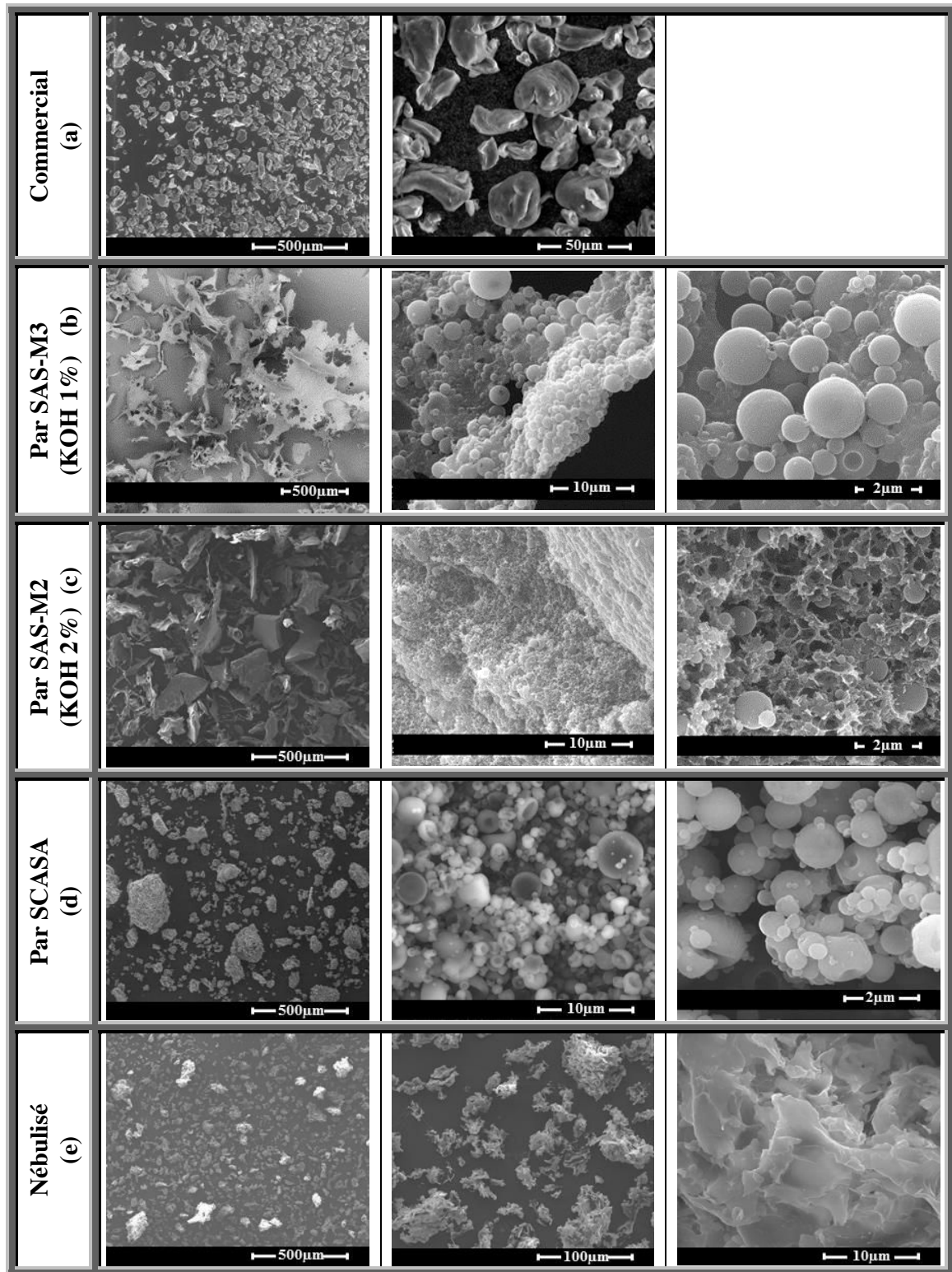


Figure 55: Clichés MEB, à différentes échelles, des morphologies particulières obtenues par les procédés de génération de particules utilisés, comparées aux particules de chitosane commercial

Les particules générées par le procédé SCASA (Figure 55d), sont sphériques. Certaines d'entre elles sont creuses, ce qui pourrait s'expliquer par la désorption du CO<sub>2</sub>, piégé dans les

sphères de chitosane, au cours de la solidification des. Les particules générées ont une distribution de taille bimodale, comme le montre la Figure 56 : des particules à l'échelle nanométrique majoritairement et des particules micrométriques composées principalement des particules nanométriques agglomérées.

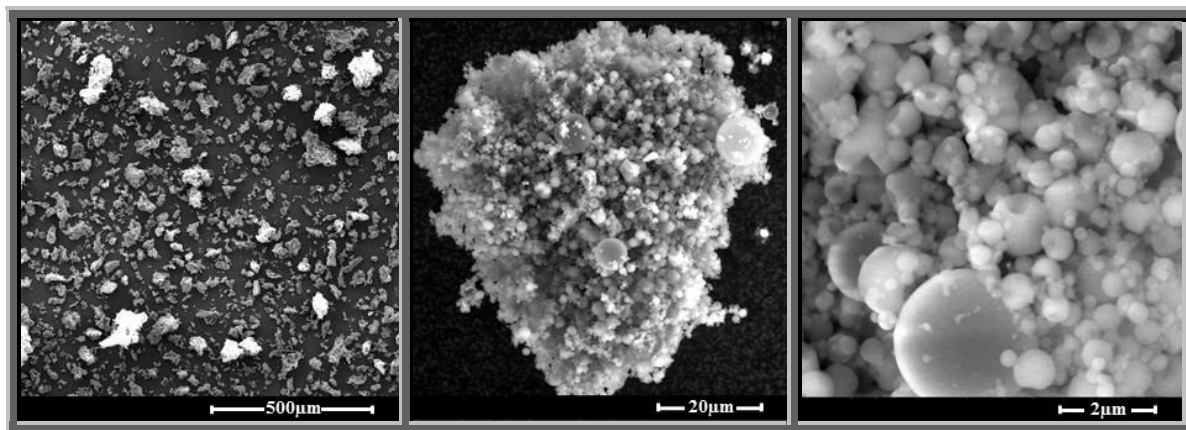


Figure 56: Les différentes échelles de structures des particules de chitosane générées par le procédé SCASA

La taille des particules aux différentes échelles a été déterminée par l'analyse des images MEB (voir Chapitre II) comme suit : une première mesure a été réalisée à l'échelle micrométrique correspondant au plus faible grossissement des images. A cette échelle, pour les différents essais réalisés par le procédé SCASA, une réduction de la taille des particules a été observée par rapport aux particules commerciales, comme le montre la Figure 57.

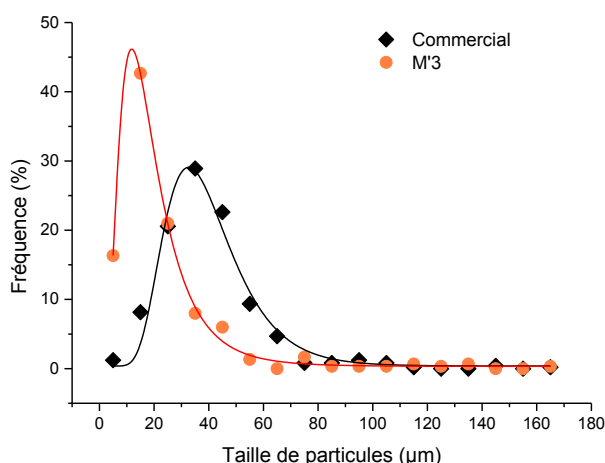


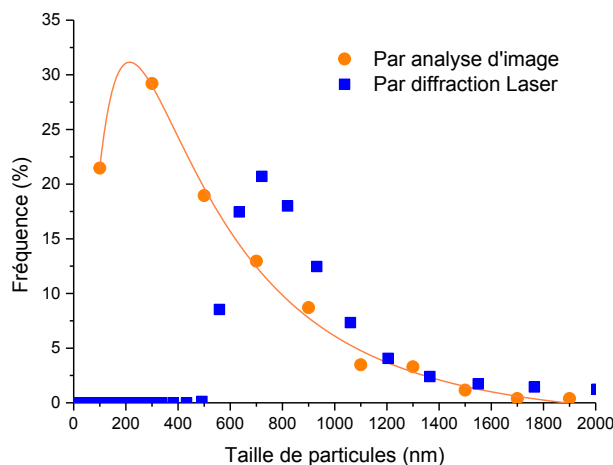
Figure 57: Distribution des tailles en nombre des particules commerciales et générées par le procédé SCASA (essai M'3), déterminée par analyse d'image MEB, à faible grossissement. Les points représentent les valeurs mesurées et les lignes représentent une loi log-normale

Une deuxième mesure a été réalisée à un plus fort grossissement au MEB, où des particules nanométriques sphériques ont pu être observées. Il était difficile de mesurer automatiquement



la taille des particules à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images du fait de leur agglomération et du manque de contraste pour identifier le contour; la mesure a été réalisée manuellement sur les clichés MEB, ce qui limite le nombre de mesures. Pour environ 500 diamètres de particules mesurés, le diamètre médian des particules était de 390 nm et moins de 15% des particules mesurées avaient une taille supérieure à 1 µm (Figure 58).

La distribution de taille a également été évaluée par diffraction laser à l'aide d'un Mastersizer 2000HS: c'est une distribution de taille en nombre monomodale avec un diamètre moyen de 721 nm. Ce diamètre est supérieur à celui obtenu par analyse d'image ; ceci peut être expliqué par la présence de quelques agrégats dans le milieu liquide (éthanol). Malgré cette différence, les résultats obtenus par ces deux méthodes de mesures semblent cohérents.



**Figure 58: Distribution en nombre des diamètres des particules générées par le procédé SCASA (essai M'3), déterminée par analyse d'image MEB à grossissement élevé et par diffraction laser en suspension dans l'éthanol par le mastersizer. Les points représentent les valeurs mesurées et la ligne est une loi log-normale**

De la même manière, la morphologie et la distribution de taille des particules générées par le procédé de nébulisation ont été évaluées par analyse d'image. Les particules générées par ce procédé, contrairement aux autres particules générées par les procédés supercritiques, ont un aspect feuilleté et une forte porosité (Figure 55e), ce qui est probablement dû au procédé de lyophilisation utilisé pour sécher les particules (tous les échantillons lyophilisés présentaient cette particularité l'échelle macrométrique). Les particules ont une distribution de taille très large, avec une taille moyenne de particules de  $39 \pm 23$  µm.

Le Tableau 20 récapitule les tailles des différents types de particules de chitosane par les différentes techniques de mesure utilisées.

**Tableau 20: Diamètres moyens et médians des différentes particules de chitosane, commerciales et générées, obtenus par les différentes techniques de mesure**

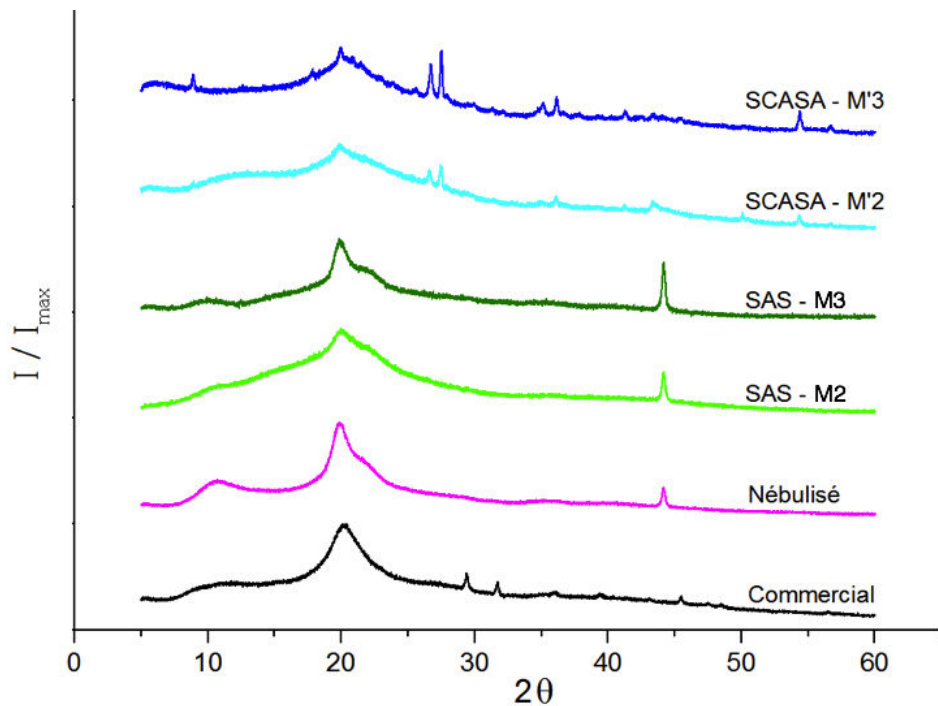
	Analyse d'images MEB	Granulomètre (sec)	Zétasizer (Ethanol)	Mastersizer (Ethanol)
Commercial	36µm (médian)	32 µm (médian)	-	-
Nébulisé	39 µm (médian)	-	-	-
SAS-M2	-	-	0,38 µm (moyen)	-
SAS-M3	-	-	0,82 µm (moyen)	-
SCASA-M'3	390 nm (médian)	-	-	791 nm (moyen)

Il est difficile de comparer la taille des particules obtenues par les procédés assistés par CO<sub>2</sub>-sc développés dans ces travaux à celles obtenues par le procédé SAA de Reverchon et *al.* (2006) [128] et le procédé SAA-HCM de Shen et *al.* (2014) [34]: les masses moléculaires des chitosanes ainsi que les concentrations des solutions étudiées diffèrent, deux paramètres qui influencent fortement la taille des particules selon Shen et *al.* (2014). L'influence des paramètres opératoires, des propriétés du chitosane et des solutions de chitosane sur la taille des particules et la distribution de taille des particules, n'a pas pu être approfondie dans le cadre de cette thèse faute de temps. Cependant, cette étude devra être entreprise au centre RAPSODEE en vue de développer et d'optimiser ce procédé.

## B. Structure cristalline des particules par diffraction des rayons X

L'analyse DRX (Figure 59) a montré que les deux procédés supercritiques permettent la génération de structures cristallines répétables mais différentes de celle du chitosane commercial.

Le rapport des intensités  $I / I_{\max}$  des pics  $2\theta \approx 10^\circ$  et  $2\theta \approx 20^\circ$  a été largement modifié au cours des trois procédés de génération de particules, surtout dans le cas des procédés SAS et SCASA. Dans la littérature, le pic autour de  $10^\circ$  est affecté à une forme structurale de chitosane: les cristaux hydratés ( $10^\circ$ ) [156]. Le pic autour de  $2\theta \approx 30^\circ$ , caractéristique de la chitine résiduelle dans le chitosane commercial, ainsi que le pic autour de  $2\theta \approx 46^\circ$  ont disparu. Avec le procédé SAS et le procédé de nébulisation, un épaulement à  $2\theta \approx 23^\circ$ , attribué à une forme allomorphique de chitosane [30] et un pic bien défini à  $2\theta \approx 44^\circ$  sont apparus. Avec le procédé SCASA, deux pics autour de  $27^\circ$  et  $28^\circ$ , non identifiés dans la littérature pour le chitosane, sont apparus.



**Figure 59: Diffractogrammes des différentes particules de chitosane étudiées : commerciale et générées par les procédés SAS (essais M2 et M3), SCASA (essais M'2 et M'3) et nébulisation**

Les deux procédés de génération de particules assistés par CO<sub>2</sub>-sc ont alors modifié d'une manière notable la structure cristalline du chitosane tout en le rendant plus amorphe (halo amorphe autour de  $2\theta \approx 20^\circ$  plus important). Il faut tout de même noter que, même si la structure cristalline de la chitine est bien étudiée dans la littérature, la structure cristalline du chitosane n'est pas encore totalement explorée, ce qui pourrait expliquer la présence de certains pics non identifiés.

Shen *et al.* (2014) ont également observé une amorphisation du chitosane avec le procédé de génération de particules SAA-HCM, qu'ils ont attribué à une brusque sursaturation dans le précipitateur, qui provoque l'évaporation rapide du solvant des gouttelettes et une cristallinité plus faible des particules générées [34]. Reverchon et Antonacci (2006) ont attribué la formation des particules amorphes de chitosane à un changement de la physico-chimie du milieu sous des températures de précipitation élevées, éventuellement associées à une désacétylation et / ou une réticulation du polymère [128]. Dans notre cas, la vitesse élevée de sursaturation est engendrée à la sortie du capillaire, ce qui induit la production de formes solides amorphes régie par la concurrence entre la cinétique de cristallisation des chaînes de chitosane et la vitesse de sursaturation.

### C. Mesure du degré d'acétylation par spectroscopie infrarouge

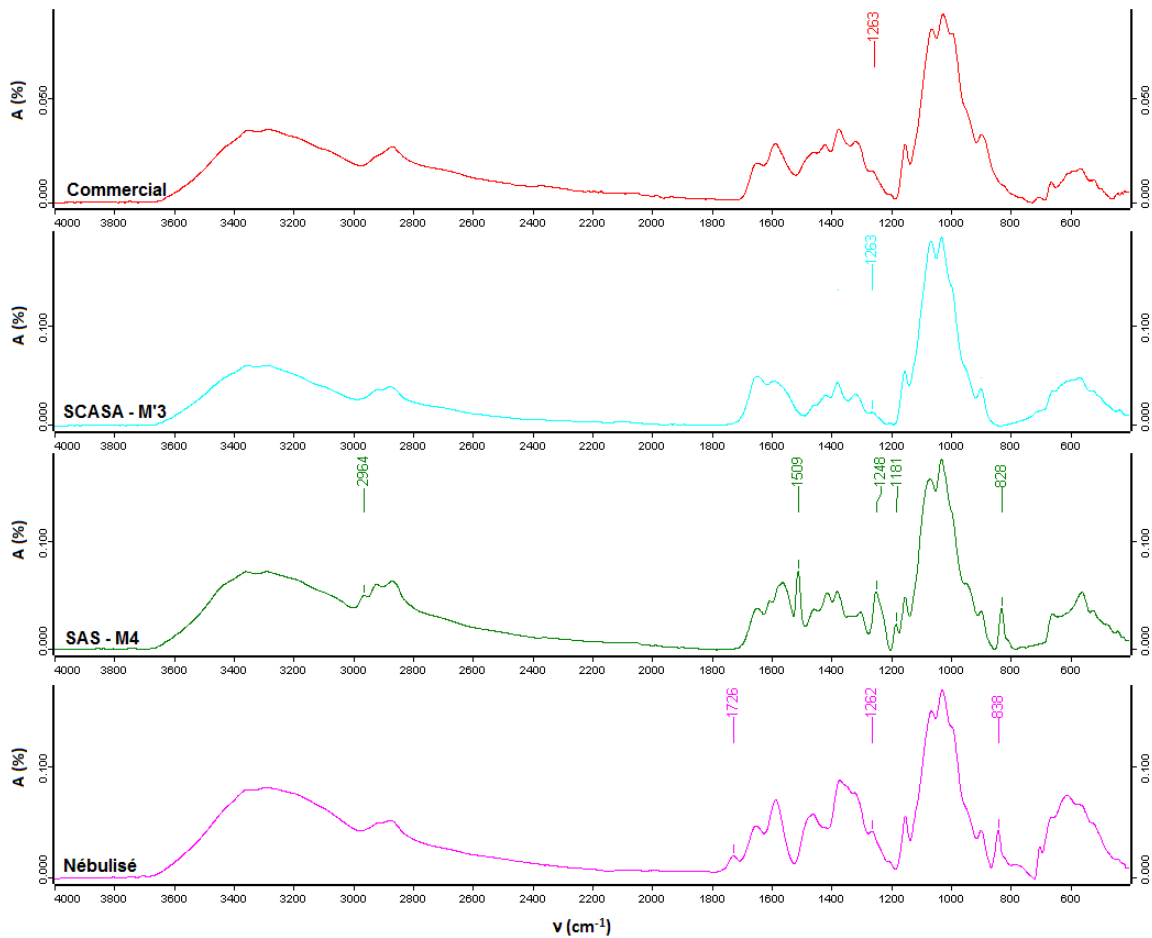
Le degré d'acétylation (DA) a été calculé selon la méthode détaillée dans le chapitre II. Les résultats présentés dans le Tableau 21 sont une moyenne de trois mesures.

**Tableau 21 : Degrés d'acétylation calculés par la méthode IR pour les différentes particules de chitosane, commercial et générées par SAS et SCASA,**

Type	$DA (\%) = 31,92 \times (A_{1420}/A_{1320}) - 12,20$
Commercial	22,17±0,02
Commercial lavé	20,25±0,11
SAS-M2	19,62±0,13
SAS-M3	19,20±0,74
SAS-M4	19,74±0,24
SAS-M5	20,06±0,58
SCASA-M'2	21,89±0,03
SCASA-M'3	22,69±0,05
SCASA-M'4	23,08±0,10
SCASA-M'5	22,75±0,03

Le DA a été trouvé entre 19 et 24% pour toutes les particules de chitosane étudiées, ce qui montre l'absence d'une influence notable des procédés utilisés pour générer les particules de chitosane sur le degré d'acétylation; les légères différences peuvent être dues à différentes erreurs liées à la technique de mesure. Pour le chitosane commercial, une différence du DA calculé (~22%) avec le DA donnée par le fournisseur (~ 10%) a été remarquée, mais aucune explication rationnelle ne pouvait être donnée. Pour cette raison, les valeurs obtenues ne sont considérées qu'à titre comparatif pour évaluer l'influence des procédés de génération sur le degré d'acétylation du chitosane généré.

Aucune différence significative n'a été observée entre le spectre IR de l'essai SCASA-M'3 et le chitosane commercial. Cependant, une différence notable peut être observée entre ces spectres et les spectres du chitosane généré par les procédés SAS et de nébulisation : plusieurs pics sont identifiés uniquement pour ces deux procédés : à 828 et 1509 cm<sup>-1</sup> pour le procédé SAS et à 838 et 1726 cm<sup>-1</sup> pour le procédé de nébulisation. De plus, l'intensité du pic à 1248-1263 cm<sup>-1</sup> diffère entre les spectres (Figure 60).



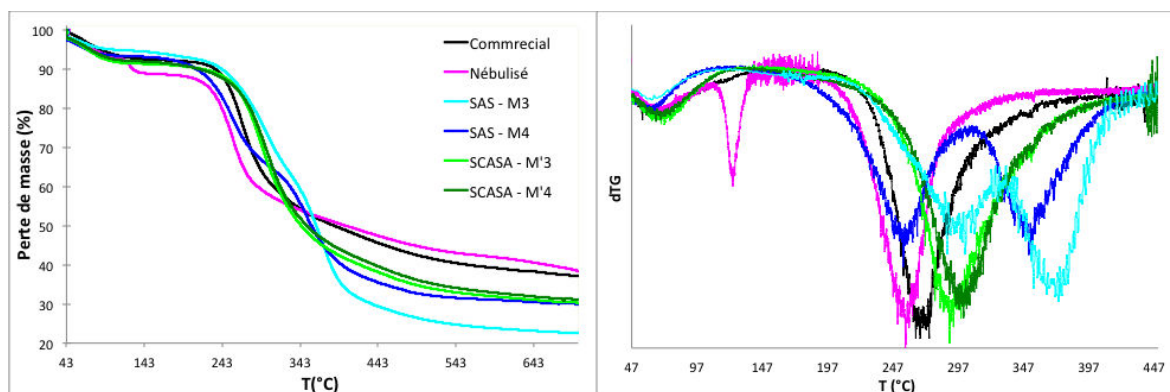
**Figure 60 : Spectres IR des particules de chitosane commercial et de chitosanes générés par le procédé SAS (essai M4), par le procédé SCASA (essai M'3) et par le procédé de nébulisation, en mode ATR**

Le pic à  $1248 - 1263 \text{ cm}^{-1}$  correspond à la liaison amine secondaire C – N, alors que les pics à  $828 - 838 \text{ cm}^{-1}$  et  $1509 \text{ cm}^{-1}$  sont caractéristiques des liaisons amines secondaires N – H en déformation. Le pic à  $1726 \text{ cm}^{-1}$  représente les liaisons C = O saturées et le pic à  $2964 \text{ cm}^{-1}$  est dû au groupement CH<sub>3</sub>. L'augmentation significative de l'intensité du pic des liaisons C – N dans le cas du procédé SAS ainsi que l'apparition des pics des liaisons N – H et CH<sub>3</sub> alors qu'ils sont absents sur le spectre du chitosane commercial signifient que, pendant le procédé SAS, une nouvelle liaison chimique est apparue: en effet, selon Nunthanid *et al.* (2004) [157], la dissolution du chitosane dans l'acide acétique induit la production de sels d'acétate de chitosane ( $\text{NH}_3^+, \text{OOC} - \text{CH}_3$ ) qui se transforment, après séchage, en groupement acétyle présent dans la (N-acétyle-D-glucosamine), motif élémentaire de la chitine [24]. Un résultat similaire a été observé par Shen *et al.* (2014) [34].

Le procédé de nébulisation montre une tendance comparable par l'apparition d'un pic à  $838\text{ cm}^{-1}$  (N-H) et du pic de  $\text{C}=\text{O}$  à  $1726\text{ cm}^{-1}$ . Cependant le spectre ne permet pas le calcul du degré d'acétylation par la corrélation utilisée (eq. 10).

#### D. Stabilité thermique des particules par analyse thermogravimétrique

L'analyse thermogravimétrique a été réalisée sur les particules de chitosane commercial ainsi que celles générées par les procédés SAS, SCASA et de nébulisation. L'objectif est de comparer la rétention d'eau et le comportement thermique de ces particules en fonction de leur procédé de génération. Les particules commerciales et les particules générées par le procédé SCASA ont un profil de perte de masse similaire avec deux phases distinctes ; les chitosanes générés par le procédé SAS et le procédé de nébulisation ont un profil de perte de masse en 3 étapes (Figure 61). Les températures et les pertes de masse relatives à ces différentes étapes sont présentées dans le Tableau 22.



**Figure 61: Courbes d'analyse thermogravimétrique et leurs dérivées (dTG) pour les particules de chitosane commercial et obtenues par procédés SAS, SCASA et par nébulisation**

Entre 25 et  $150^{\circ}\text{C}$ , toutes les particules présentent une première perte de masse comprise entre 7 et 10% environ, liée à la déshydratation du matériau : la présence des groupements  $-\text{OH}$  et amines sur les chaînes de chitosane permettent la fixation de molécules d'eau avec des liaisons fortes et moins fortes respectivement, ce qui explique le début de la déshydratation pour des températures inférieures à  $100^{\circ}\text{C}$  [158]. Entre 106 et  $165^{\circ}\text{C}$ , seul le chitosane nébulisé présente une perte de masse d'environ 4% ( $T_{\text{pic}}$  à  $123^{\circ}\text{C}$ ); celle-ci est probablement associée à la présence des sels hydratés tels que l'acétate de sodium, issus du procédé de génération, qui n'ont pas été éliminés par le lavage et qui ont libéré les molécules d'eau contenues dans les cristaux sur cette plage de température [159]. Cette présence résiduelle de sels est confirmée par une analyse du taux de carbone organique COT (Tableau 23) qui a montré la présence de carbone inorganique dans le chitosane nébulisé.

Mise à part le chitosane nébulisé qui montre une rétention d'eau de l'ordre de 12%, les résultats ne montrent pas alors d'influence significative des deux procédés supercritiques adoptés pour générer les particules de chitosane sur la quantité d'eau retenue, qui reste équivalente à celle des particules commerciales (~8%). Néanmoins, on constate que cette perte de masse débute légèrement plus tôt pour les particules générées par le procédé SAS ( $T_{pic}$  de dTG à 60°C) par rapport aux autres particules ( $T_{pic}$  à 67°C).

**Tableau 22: Pertes de masse relative et températures caractéristiques des pics pour les différentes particules de chitosane étudiées, entre 25 et 700°C**

	1 <sup>ère</sup> perte de masse			2 <sup>ème</sup> perte de masse			3 <sup>ème</sup> perte de masse			Résidu
	T (°C)	$T_{pic}$ (°C)	$\Delta m$ (%)	T (°C)	$T_{pic}$ (°C)	$\Delta m$ (%)	T (°C)	$T_{pic}$ (°C)	$\Delta m$ (%)	
Commercial	25-148	66	8,2± 0,5	148-700	267	55,1±0,1	-	-	-	36,7±0,4
Nébulisé	25-106	65	7,9± 0,6	106-165	123	4,1 ± 0,1	165-700	253	50,2±0,1	37,8±0,5
SAS – M3	25-145	60	8,0± 1,2	134-304	295	27,9±1,0	304-700	367	34,1±0,1	30,0±0,0
SAS – M4	25-148	60	6,6± 0,9	148-334	253	30,7±0,4	334-700	352	40,4±0,3	22,3±0,2
SCASA – M3	25-147	66	9,6± 0,8	147-700	290	60,3±0,6	-	-	-	30,1±0,2
SCASA – M4	25-147	66	8,8± 0,6	147-700	297	60,2±0,5	-	-	-	31,0±0,1

Dans la région comprise entre 150 et 700°C, deux pertes de masse ont été observées pour les chitosanes générés par le procédé SAS ( $T_{pic}$  à 295°C et 367°C pour SAS-M3,  $T_{pic}$  à 253°C et 352°C pour SAS-M4) alors que les autres particules n'en ont subi qu'une seule. Par rapport au chitosane commercial qui se dégrade autour de  $T_{pic}=267°C$ , le chitosane nébulisé et le chitosane de SAS – M4 se dégradent à une température plus basse ( $T_{pic}=253°C$ ) alors que les chitosanes générés par les procédés SCASA et SAS-M3 ont une température de dégradation plus élevée ( $T_{pic}$  entre 290°C et 297°C). La différence des températures de dégradation de SAS-M3 et SAS-M4 n'est pas encore bien comprise ; dans la littérature, à notre connaissance, les propriétés thermiques du chitosane généré en présence d'un milieu alcalin n'ont pas été spécifiées. Une explication possible de cette différence de dégradation pourrait être la présence de sels résiduels (acétate de potassium en particulier) dans la structure solide de chitosane malgré le lavage. Ces sels fondent autour de 292°C ce qui pourrait être à l'origine de la deuxième dégradation autour de 352°C et 367°C. Nam et *al.* (2010) ont constaté que l'augmentation du degré d'acétylation du chitosane provoque l'amélioration de sa stabilité thermique grâce à la meilleure stabilité des unités acétylées du chitosane [160]. Dans notre cas, une apparition des groupements acétyles sur les spectres IR (voir paragraphe précédent) a été observée sur les spectres de SAS-M3, SAS-M4 et du chitosane nébulisé mais le degré d'acétylation n'a pas été estimé significativement différent entre les différentes particules de chitosane ; le degré d'acétylation ne peut pas être alors à l'origine de cette différence de profil

de dégradation. De plus, la masse résiduelle non dégradée pour le SAS-M3 qui est significativement inférieure à celle des autres particules peut être due à la morphologie poreuse de ce matériau généré qui est plus facilement dégradable qu'un matériau dense. Par le procédé SCASA, la dégradation du chitosane se fait en une seule étape comme le chitosane commercial, mais à une température plus élevée ( $T_{pic}$  entre 290°C et 297°C), ce qui montre que ce procédé permet la génération de particules de chitosane plus stables thermiquement que les autres types de particules.

**Tableau 23: Taux de carbone organique et inorganique mesurés par COT-mètre**

Echantillon	Taux de carbone total (%)	Taux de carbone organique (%)	Taux de carbone minéral (%) (par soustraction)
Commercial	36,6	35,6	0,9
Nébulisé	29,8	25,0	4,7
SCASA-M'3	37,1	37,7	0
SAS M3	44,1	43,8	0,3
SAS M4	39,3	35,2	4,2



### **III. Conclusions sur la génération des nanoparticules de chitosane par les procédés SAS et SCASA**

- **le procédé SAS permet l'obtention de nanoparticules de chitosane mais demande encore à être amélioré**

Le procédé SAS (Supercritical AntiSolvent) a été adapté pour la génération des particules de chitosane. Des nanoparticules sphériques et denses de chitosane ont été générées via ce procédé. Cependant, l'aspect et la morphologie des particules diffèrent selon les conditions de récupération : pour un milieu de récupération à 2% en KOH, des nanoparticules intégrées dans un réseau poreux formé de particules encore plus fines ont été observées ; le diamètre moyen de ces particules en suspension dans l'éthanol est de  $378 \pm 13$  nm. Une solution de récupération à 1% en KOH a permis l'obtention de nanoparticules mieux définies avec un diamètre moyen en suspension dans l'éthanol de  $820 \pm 19$  nm.

Néanmoins, ce procédé s'est avéré non reproductible. En effet, la sensibilité du chitosane à la physico-chimie du milieu, surtout au pH qui évolue progressivement au cours de la dissolution et du dégazage du CO<sub>2</sub>, ainsi que la phase de lavage à l'eau et le séchage, semblent altérer la morphologie finale des particules. La fourchette opératoire du pH est très réduite et difficilement contrôlable sous pression : quand le pH est inférieur au pK<sub>a</sub> du chitosane, une dissolution du chitosane a lieu ; au contraire, lorsque le milieu est très basique, une agglomération des particules et la formation d'un réseau sont observées.

Pour contrôler ce procédé, il est donc nécessaire d'améliorer la stabilité des particules en maîtrisant l'effet anti-solvant du CO<sub>2</sub>-sc, l'effet du milieu basique ainsi que le post traitement pour obtenir des particules sèches et exemptes de résidus chimiques.

- **Conclusion : SCASA, un procédé original de production de nanoparticules de chitosane**

Le procédé SCASA (Supercritical CO<sub>2</sub> Assisted Solubilization and Atomization), mis en place dans cette étude, a montré sa capacité à générer de façon reproductible des nanoparticules de chitosane sèches sans avoir recours à aucun acide organique, en utilisant simplement le pouvoir acidifiant du CO<sub>2</sub> dissous dans l'eau pour solubiliser le chitosane. Le diamètre médian des particules obtenues est de 390 nm.

Ces résultats ne représentent que la phase préliminaire de l'étude du procédé SCASA. L'influence des paramètres opératoires (temps de dissolution, paramètres de pulvérisation,

dispositif de collecte ...), des propriétés du chitosane (origine, masse moléculaire, degré d'acétylation ...) et de la concentration des solutions sur le rendement, la forme et la structure des particules et leur distribution de taille nécessitera des études complémentaires.

En outre, par rapport aux procédés utilisant des acides organiques tels que l'acide acétique et l'acide citrique, aucun solvant résiduel n'est présent dans les particules générées et ce sans lavage postérieur. Ainsi, pour des applications spécifiques où la présence d'acide résiduel ne serait pas souhaitable, comme le transfert de médicaments [161], le procédé SCASA apparaît très avantageux.

➤ **Conclusions sur les propriétés des nanoparticules générées par les procédés SAS et SCASA**

Les deux procédés de générations assistés par CO<sub>2</sub>-sc ne semblent pas modifier le degré d'acétylation du chitosane. Ils ont cependant un impact notable sur la structure cristalline du polymère en le rendant plus amorphe. Les profils de dégradation thermique des particules de chitosane générées diffèrent de celui du chitosane commercial : la dégradation des particules de chitosane générées par le procédé SCASA est légèrement décalée vers les hautes températures, signe d'une meilleure stabilité thermique ; les particules générées par le procédé SAS présentent deux pics de dégradation qui pourraient être dûs à la présence des sels résiduels provenant de la solution de récupération.

Au vu des résultats obtenus, c'est le procédé SCASA qui a été retenu en priorité pour fournir les nanoparticules nécessaires à l'élaboration des biocomposites à matrices PLA et PHBV.



**CHAPITRE IV.**  
**ELABORATION ET PROPRIETES DES**  
**FILMS BIOCOMPOSITES PLA/CHITOSANE**  
**ET PHBV/CHITOSANE**

Dans ce chapitre est abordée la question de l'élaboration de nanocomposites totalement issus de ressources renouvelables à partir de deux matrices biopolyesters (PLA et PHBV) et du chitosane comme charge particulaire. L'état de la dispersion du chitosane dans ce type de matrice n'est actuellement que peu étudié, et encore moins par voie fondue. Dans ce cadre, une étude sur l'impact des charges générées sur différentes propriétés de ces biopolyesters a été effectuée.

## I. Etude des propriétés morphologiques et microstructurelles des matériaux à base de PLA, de PHBV et leurs composites

### A. Evaluation de la dispersion des particules de chitosane dans les films de PLA et PHBV

L'analyse de la dispersion des particules de chitosane dans les films biopolyesters a été réalisée à trois niveaux: une analyse visuelle, une analyse par microscopie optique et une analyse par microscopie électronique à transmission.

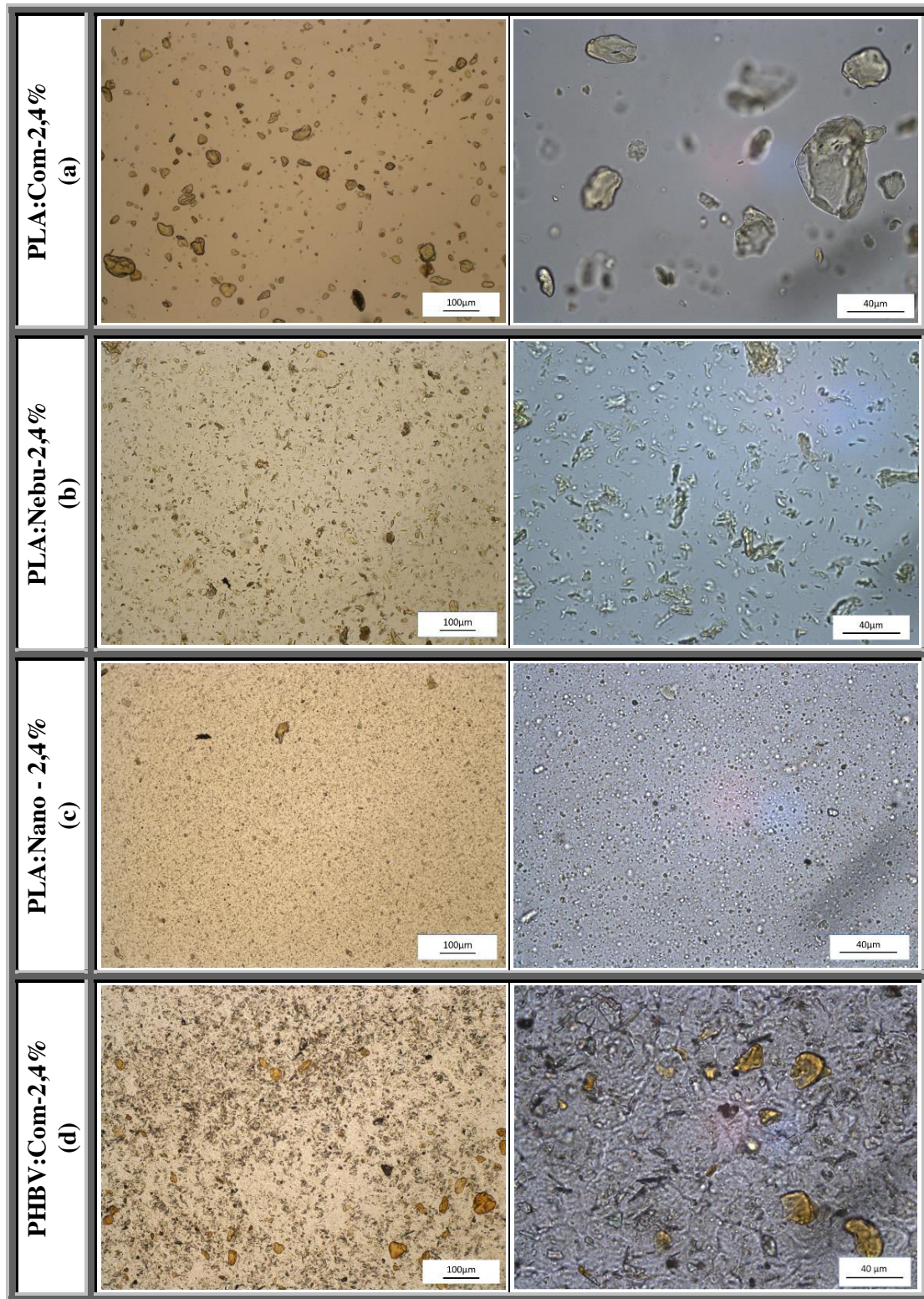
Indépendamment du type de particules de chitosane utilisé, un jaunissement du film et une augmentation de la rugosité ont été constatés lors de l'incorporation des particules par rapport au film de PLA seul (Figure 62).



Figure 62: Films de PLA Pur et de PLA:Com-2,4% obtenus par extrusion

Dans les mêmes conditions opératoires, la présence de particules de chitosane dans le PLA semble réduire la viscosité du composite durant l'extrusion en le rendant plus fluide. Ensuite, les films composites paraissent moins ductiles que les films de PLA seul.

Généralement et indépendamment de la nature des particules de chitosane utilisées, aucune agglomération significative de particules n'a été observée. Ceci est le signe d'une bonne dispersion dans la matrice (Figure 63).



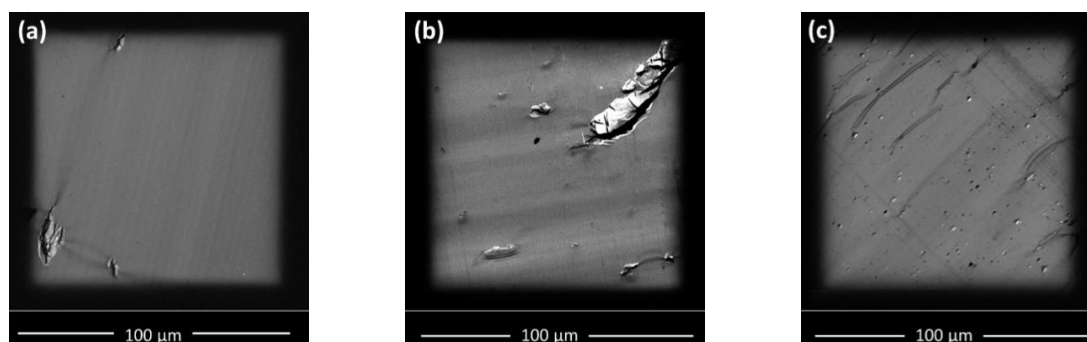
**Figure 63: Dispersion des différentes particules de chitosane dans les matrices PLA et PHBV à deux grossissements (x4 et x40)**

Les larges particules de chitosane commercial sont facilement identifiées au sein du film de PLA et leur taille ne semble pas être modifiée après extrusion. Les particules nébulisées sont

identifiables avec une forme particulière aléatoire mais elles semblent avoir une taille plus petite après l'opération d'extrusion. En revanche, les particules générées par le procédé SCASA sont difficilement identifiables dans le film et seules quelques larges particules sont repérées pouvant être des traces résiduelles des essais précédents, des impuretés dans les particules lors de la phase de récupération ou encore, certaines nanoparticules agglomérées qui n'ont pas été dispersées pendant la phase d'extrusion. Une superposition de plusieurs plans de ces particules fines dans l'épaisseur du film de PLA rend leur observation plus compliquée. De manière générale, les particules micrométriques générées par le procédé SCASA, formées majoritairement par des nanoparticules agglomérées, semblent être correctement désagrégées et dispersées dans la matrice de PLA lors de l'extrusion. Toutefois, il faut noter que dans ces conditions, le procédé d'extrusion n'était pas suffisant pour individualiser les particules nanométriques. Dans la suite, on conservera le terme « nanométrique » ou le préfixe « Nano » pour faciliter la désignation de ces particules.

L'observation des films composites de PHBV était plus difficile que celle des films de PLA, en raison de l'opacité du matériau mais, comme le montre la Figure 63d, la dispersion semble similaire à celle observée dans le PLA.

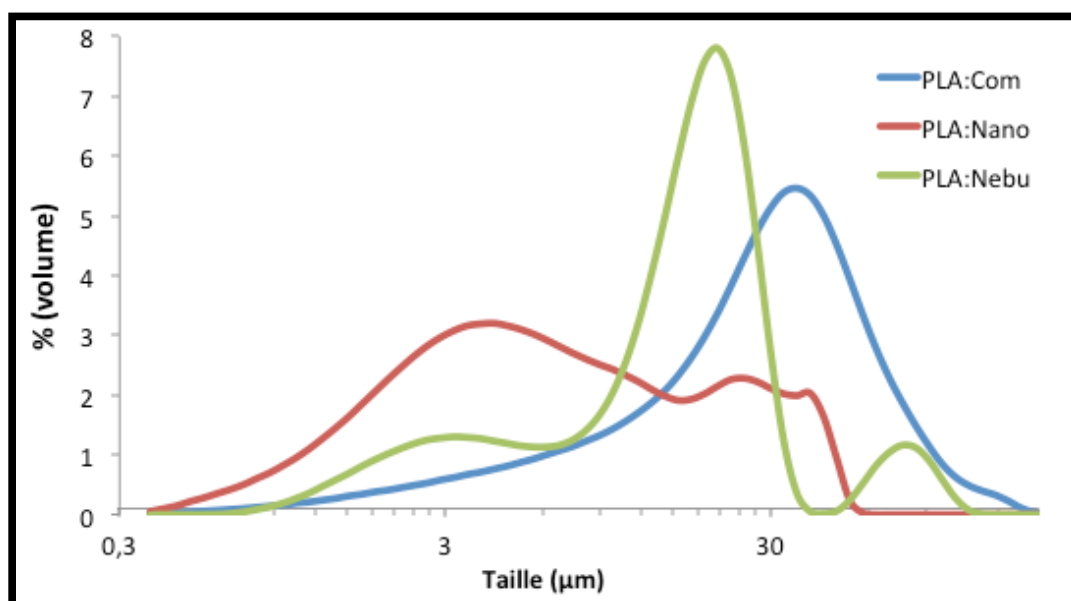
Toutefois, pour la même fraction massique de chitosane, différentes morphologies de dispersion ont pu être observées en fonction du type de particules ; ceci est visible sur les images à fort grossissement. Dans le cas des films « PLA:Com », la dispersion des particules dans la matrice laisse une large zone de cette dernière sans particules (Figure 63a) ; cette zone « vide » semble moins large dans le cas des films « PLA:Nebu » (Figure 63b) et largement plus étroite pour les films « PLA:Nano ». Les mêmes constatations peuvent être faites sur les clichés obtenus par microscopie électronique à transmission (TEM) des coupes au microtome des joncs composites (Figure 64).



**Figure 64: Clichés TEM montrant la dispersion des différentes particules de chitosane dans la matrice PLA à un taux de charge de 2,4%. (a) particules commerciales, (b) particules nébulisées et (c) particules générées par le procédé SCASA**

Cette différence d'homogénéité peut être expliquée par la disparité entre les tailles et surfaces spécifiques des différentes particules : les particules générées par le procédé SCASA qui ont, en majorité, une taille inférieure à  $2\mu\text{m}$  dans le composite disposent d'une surface spécifique plus importante que celle des particules nébulisées et des particules commerciales. Les particules générées par ce procédé ont permis une meilleure dispersion et répartition dans les films composites.

La distribution de taille des particules dans les films après extrusion a été mesurée par granulométrie en voie liquide après dissolution des films de PLA dans le chloroforme (Figure 65). Le procédé d'extrusion ne semble pas avoir impacté la taille des particules de chitosane commercial, cependant, une légère réduction de la taille des particules nébulisées peut être observée (voir Chapitre III). Une réduction significative de la taille des agglomérats des particules nanométriques peut être remarquée après extrusion, ce qui confirme nos observations par microscopie optique.



**Figure 65: Distribution de taille en volume des particules de chitosane après extrusion obtenue par granulométrie en voie liquide après dissolution des films de PLA dans le chloroforme**

Il faut noter que l'appareillage de mesure utilisé ne permet pas d'observer les particules les plus fines (limite à 400 nm). Des analyses sont en cours par un autre appareillage pour obtenir les tailles ultimes des particules.



## **B. Etude de la cristallisation du PLA, du PHBV et de leurs composites**

Dans le paragraphe suivant, nous nous intéressons à la cristallisation des composites en évaluant l'effet du type et de la concentration des particules de chitosane sur la cristallinité des composites et en particulier, les températures, les taux et la cinétique de cristallisation.

### **1. Effet de la mise en œuvre et de la présence des particules de chitosane sur la cristallisation anisotherme du PLA et du PHBV**

Une première approche consiste à étudier la cristallisation des composites par un cycle anisotherme de montée-descente-montée en température. La comparaison entre la première et la deuxième montée en température permettra de mettre en évidence l'effet du procédé d'extrusion ; les phénomènes observés lors de la deuxième montée ne sont en effet fonction que de l'effet des charges puisque l'histoire thermo-mécanique liée au procédé est effacée par la première fusion du matériau.

#### **a. Cas des films composites à base de PLA**

Le PLA est un polymère à cristallisation lente ce qui explique l'absence d'exotherme au cours du refroidissement et son apparition sur les thermogrammes de chauffe pour les deux niveaux de charge testés, 2,4% (Figure 66) et 10% (Figure 67) En effet, la vitesse de refroidissement est trop rapide pour permettre la formation des cristaux et leur croissance avant la réduction de la mobilité moléculaire par refroidissement. Une chauffe postérieure permettra d'atteindre la mobilité moléculaire nécessaire pour cette croissance [162]. Ce phénomène est connu sous le nom de la « cristallisation froide ».

Il faut aussi remarquer que tous les échantillons présentent une variation enthalpique aux alentours de 60°C correspondant au passage de la transition vitreuse et à la relaxation des chaînes moléculaires de la partie amorphe du polyester.

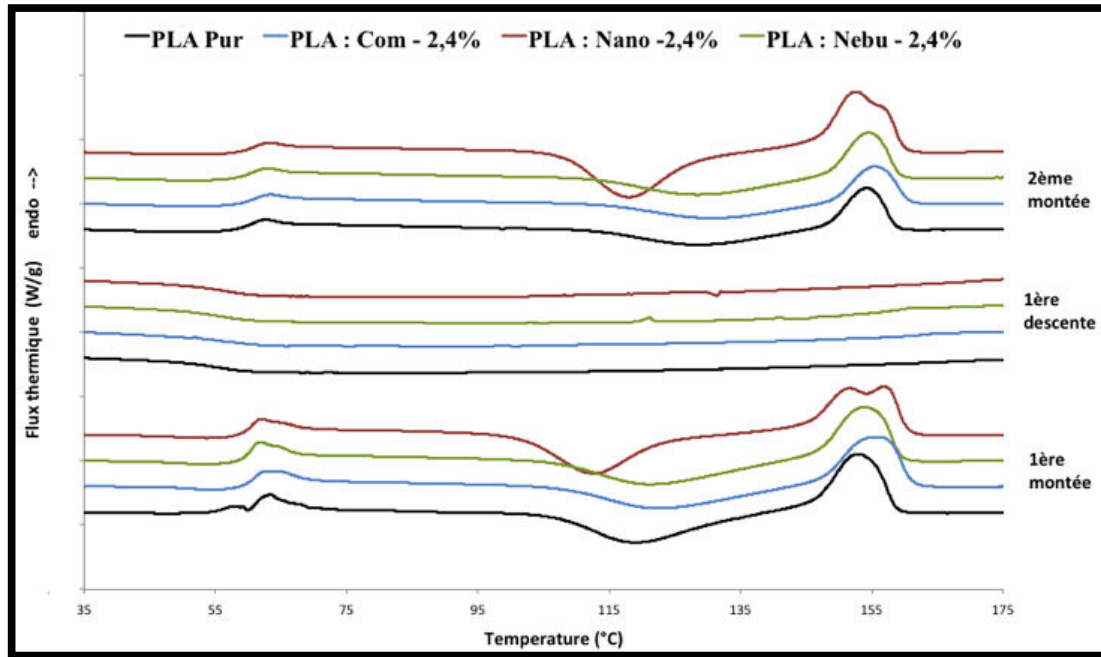


Figure 66: Thermogrammes enregistrés par DSC lors d'un cycle de température montée-descente-montée de 35 à 180°C pour « PLA Pur », « PLA:Com-2,4% », « PLA:Nebu-2,4% » et « PLA:Nano-2,4% »

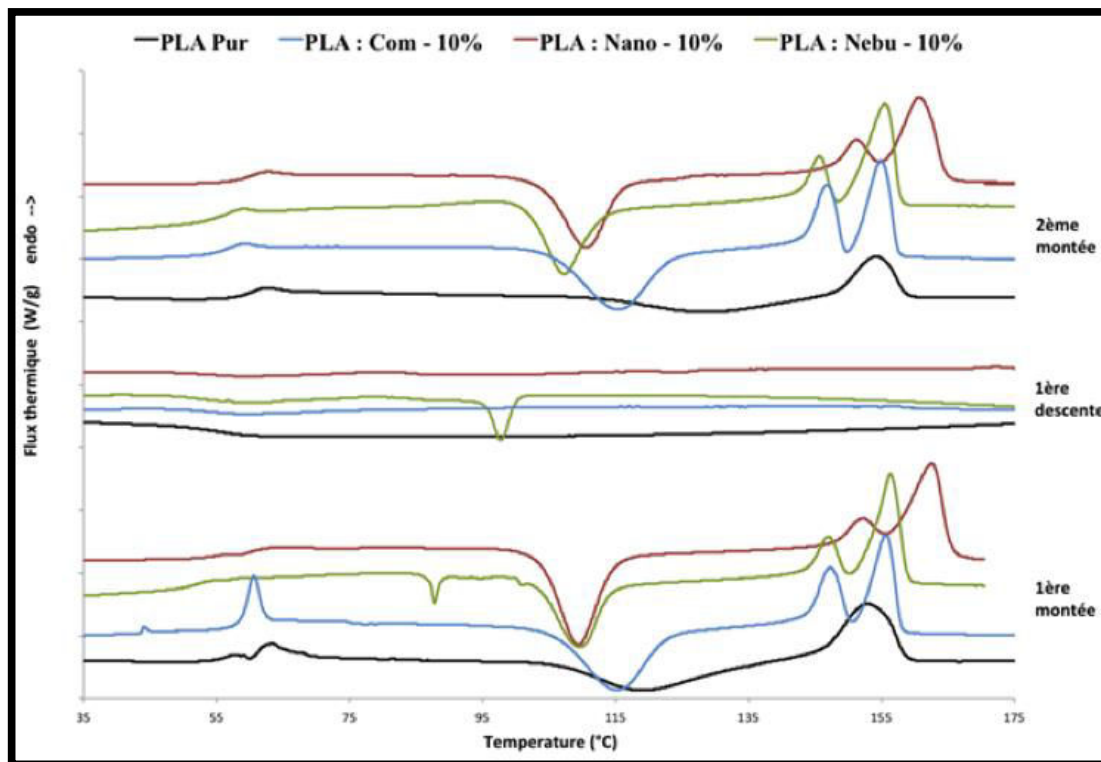


Figure 67: Thermogrammes enregistrés par DSC lors d'un cycle de température montée-descente-montée de 35 à 180°C pour « PLA Pur », « PLA:Com-10% », « PLA:Nebu-10% » et « PLA:Nano-10% »

*i. Effet de la mise en œuvre : comparaison entre la première et la deuxième chauffe*

Dans le cas du PLA et de ses composites à 2,4% et 10% de charge de chitosane commercial, nébulisées et nanométriques, aucun changement significatif n'est observé au niveau des températures de transition vitreuse  $T_g$  et de fusion  $T_f$  des différents matériaux entre la première et la seconde chauffe. Cependant, les différents pics de cristallisation froide sont décalés vers des plus hautes températures lors de la deuxième montée (décalage beaucoup plus marqué pour les composites à 2,4% de charge de l'ordre de 5°C). Ceci montre que le procédé d'extrusion a accéléré le début de la cristallisation du PLA et de ses composites, possiblement à cause de l'organisation locale des chaînes générée durant le procédé d'extrusion, qui a favorisé la germination et la cristallisation des sphérolites lors de la cristallisation froide. Peurton (2008) a aussi avancé cette hypothèse pour expliquer la présence d'un pic de cristallisation froide pour un PLA extrudé et son absence pour le granulé de PLA [162]. L'apparition des pics exothermiques autour de 80°C et 95°C lors des premières montée-descente du PLA:Nebu-10% reste encore inexplicée.

Dans le calcul des enthalpies, la fraction massique des particules dans le composite est prise en considération. L'enthalpie de fusion  $\Delta H_f$  représente l'énergie nécessaire pour fondre l'ensemble des cristaux présents dans le matériau dans l'état considéré. L'enthalpie de cristallisation froide  $\Delta H_{cc}$  observée représente l'énergie libérée par la cristallisation froide. Toutes les données liées à la première chauffe sont présentées dans le Tableau 24. Le taux de cristallinité des matériaux à la sortie du procédé d'extrusion  $\chi_{c0}$  peut alors être évalué selon l'équation eq. 5.

Pour tous les composites, le taux de cristallinité  $\chi_{c0}$  ne dépasse pas les 3% (sauf dans le cas de PLA:Nano-10%, il est autour de 5%). Les films composites à la sortie de l'extrudeuse sont donc quasiment amorphes.

**Tableau 24 : Températures et enthalpies de fusion et de cristallisation et taux de cristallinité obtenus pour les films composite de PLA avec les différentes charges de chitosane durant la première chauffe**

	$T_{cc}$ (°C)	$\Delta H_{cc}$ (J.g <sup>-1</sup> )	$T_{f1}$ (°C)	$T_{f2}$ (°C)	$\Delta H_f$ (J.g <sup>-1</sup> )	$T_g$ (°C)	$\chi_{c0}$ (%)	$\chi_{cf}$ (%)
Pur PLA	119,1±0,2	21,1±2,1	152,9±0,1		23,3± 1,0	60,9± 0,0	2,3±1,2	25,6±1,1
PLA:Nano-2,4%	111,7± 0,9	25,4±1,7	152,2±0,5	158,1±1,3	27,5±0,3	62,3±1,6	2,2±1,5	30,2±0,4
PLA:Nebu-2,4%	125,7± 2,8	19,7±4,5	155,7±1,2		19,6± 5,0	59,7± 0,7	0,2 ± 0,6	21,49± 5,5
PLA:Com-2,4%	125,9±3,7	19,7±0,5	156,5±1,0		20,1±2,6	61,4±0,6	0,5±0,5	22,13± 2,8
PLA:Nano-10%	107,7±1,7	34,2±0,0	152,1±1,0	162,3±0,2	39,0±0,8	58,7±1,0	5,3±0,9	42,9±0,9
PLA:Com-10%	115,1±0,0	37,9±2,8	146,9±0,1	155,4±0,0	38,2±2,8	58,4±0,6	0,4±0,1	42,0±3,1

### ii. Effet des particules de chitosane

Dans ce paragraphe, on s'intéresse uniquement à la seconde chauffe qui met en évidence l'effet des charges de chitosane sur la cristallisation du PLA. Sur ce thermogramme, la présence de 2,4% de particules de chitosane ne semble pas affecter la température de transition vitreuse  $T_g$  du PLA qui reste de  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  pour tous les films. Néanmoins, une baisse non négligeable de la température de transition vitreuse peut être observée quand le taux de charge augmente à 10% surtout dans le cas films à base de charges de chitosane commercial et nébulisées pour lesquels la transition vitreuse est de  $56,2^\circ\text{C}$  et  $55,7^\circ\text{C}$ , respectivement (Figure 68).

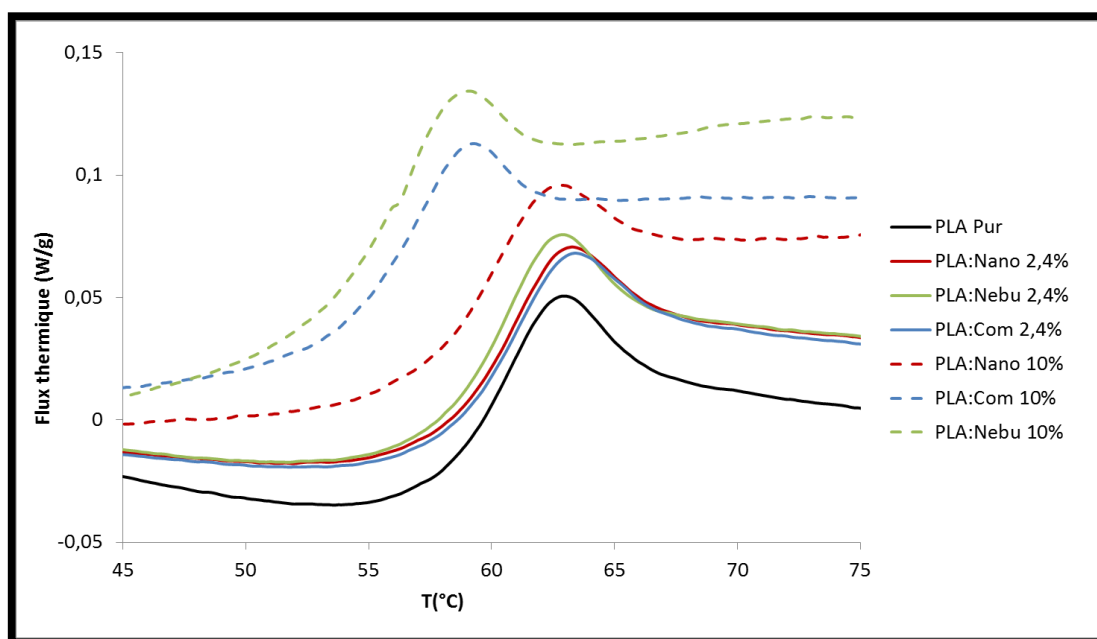


Figure 68: Température de transition vitreuse du PLA et de ses composites au cours de la deuxième chauffe (endo  $\uparrow$ )

Une explication qui pourrait justifier le décalage de la transition vitreuse vers les basses températures, caractéristique d'une augmentation de la mobilité moléculaire, serait la réduction de la longueur des chaînes moléculaires de PLA par la présence d'un fort taux de charge qui augmente de façon significative le taux de cisaillement lors du procédé d'extrusion et entraîne une dégradation des chaînes. La mesure de la masse moléculaire de ces différents films composite PLA/chitosane est un élément qui permet de vérifier cette hypothèse (Tableau 25). On constate en effet que les masses moléculaires moyennes  $M_w$  et  $M_n$  pour les films chargés à 10% de chitosane commercial et nébulisé sont divisées par 3 environ alors qu'elles restent dans le même ordre de grandeur pour le film chargé à 10% de chitosane nanométrique. On note par ailleurs que le procédé d'extrusion-*cast* n'a pas d'effet significatif

sur le PLA pur, ce qui met bien en évidence l'effet marqué des forts taux de charge sur la diminution de la masse moléculaires.

**Tableau 25: Masses moléculaires des granulés de PLA non extrudés et des films de PLA Pur et de ses composites mesurées par GPC**

	$M_w$	$M_n$	$M_v$	$M_p$	$M_z$	IP
PLA granulé	163937	92135	151992	131173	253241	1,8
PLA Pur (film)	176206	103145	165238	143218	255019	1,7
PLA:Nebu-2,4% (film)	155924	85041	145261	133228	237187	1,8
PLA:Com-2,4% (film)	133732	71587	124140	112542	204416	1,9
PLA:Nano-10% (film)	172438	100256	161502	141138	251932	1,7
PLA:Nebu-10% (film)	57877	29444	53402	51114	91532	2,0
PLA:Com-10% (film)	58666	29510	54085	50350	93083	2,0

Deux différences importantes peuvent être observées entre les thermogrammes des composites en fonction de la nature et du taux de charge utilisés : la première est liée au pic de cristallisation froide et la deuxième au pic de fusion (Figure 69).

Le pic de cristallisation froide est plus étroit et décalé vers les basses températures quand la taille des particules diminue ou quand le taux de charge augmente. Ceci peut être le signe d'une cristallisation froide prématurée de la matrice : la différence entre le PLA:Com-2,4%, le PLA:Nebu-2,4% et le PLA Pur est très faiblement marquée (mais en faveur du PLA:Nebu-2,4%) avec un pic de cristallisation froide autour de 130°C et très étalé ; les enthalpies de cristallisation associées sont faibles et mesurées entre 8 et 13 J.g<sup>-1</sup>. Cependant, le PLA:Nano-2,4% présente une baisse significative de la température de cristallisation froide de l'ordre de 10°C et une augmentation très importante de l'enthalpie de cristallisation froide qui est de 26,7 J.g<sup>-1</sup>. Cette différence est encore plus marquée quand le taux de particules augmente, avec des températures de cristallisation froide de 36, 26,7 et 31,2 J.g<sup>-1</sup> pour les films PLA:Com-10%, le PLA:Nebu-10% et PLA:Nano-10%.

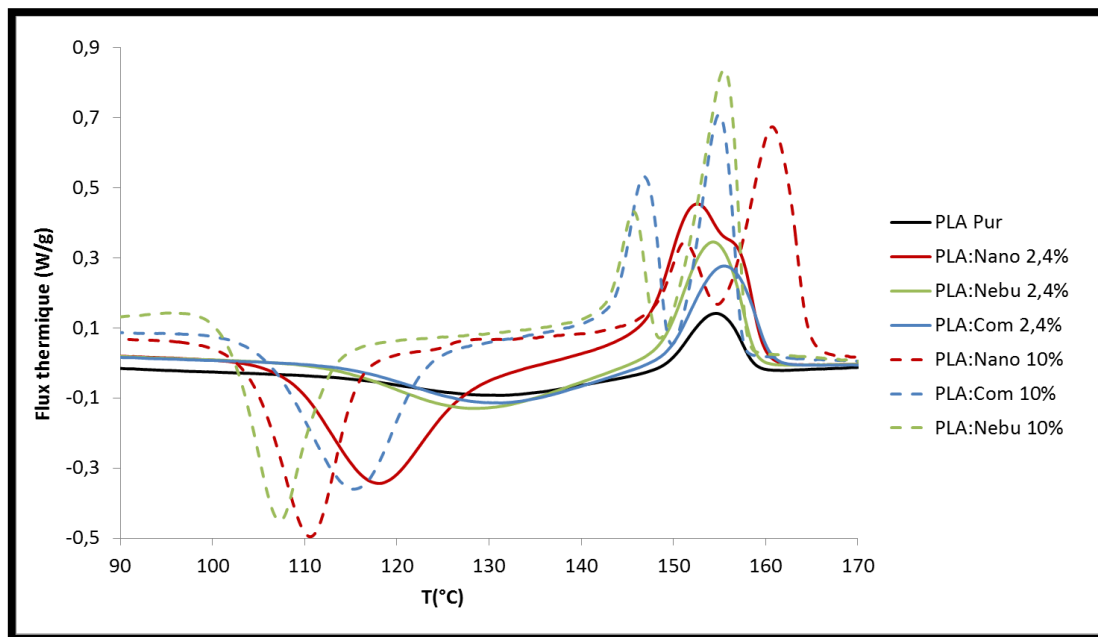


Figure 69: Pics de cristallisation froide et de fusion du PLA et de ses composites au cours de la deuxième chauffe (endo ↑)

Deux explications peuvent être à l’origine de ce phénomène : la première serait la réduction de la longueur des chaînes par la présence de ces charges qui a favorisé la mobilité moléculaire et avancer et favoriser la cristallisation froide ; la deuxième serait liée à un effet nucléant de ces charges. Dans le cas des films PLA:Nano 10%, aucune réduction de la masse moléculaire liée ni au procédé d’extrusion ni aux charges nanométriques n’a été observé (Tableau 25), ce qui laisse supposer que les particules nanométriques ont joué le rôle d’agent nucléant dans le PLA. Dans le cas des charges commerciales et nébulisées, la dégradation du matériau par la présence de ces charges durant le procédé d’extrusion est très marquée, ce qui laisse supposer que la dégradation des chaînes de PLA est la raison principale de la modification de la cristallisation froide.

Tableau 26: Températures, enthalpies et taux de cristallinité obtenus pour les composites de PLA durant la seconde chauffe

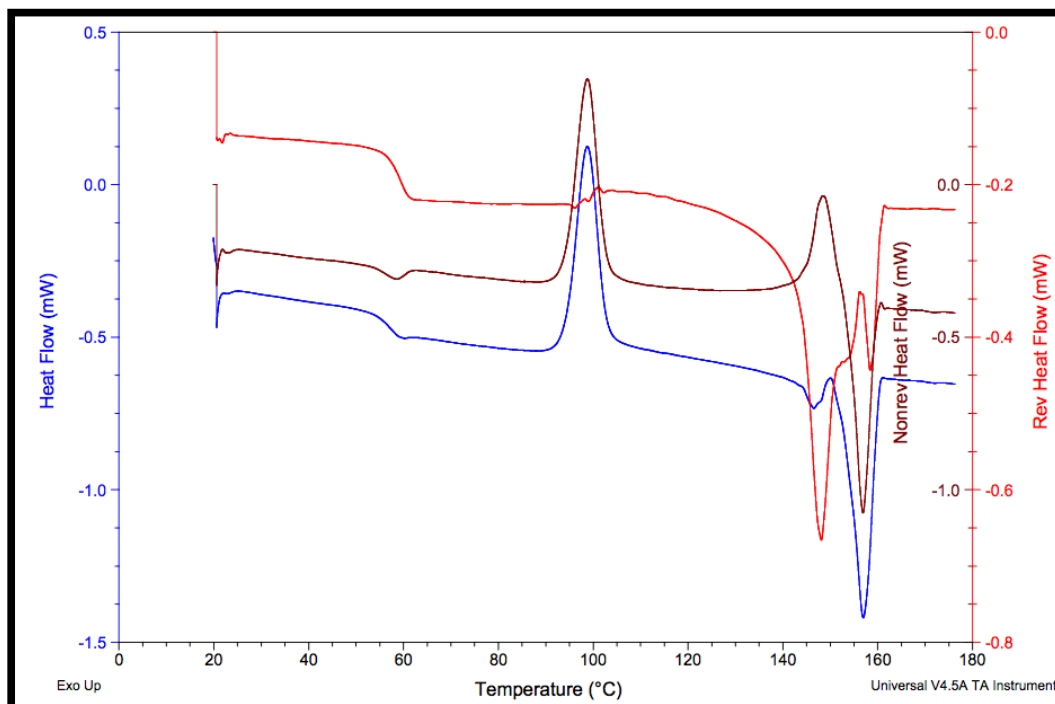
	$T_{cc}$ (°C)	$\Delta H_{cc}$ (J.g <sup>-1</sup> )	$T_{f1}$ (°C)	$T_{f2}$ (°C)	$\Delta H_f$ (J.g <sup>-1</sup> )	$T_g$ (°C)	$\chi_{c0}$ (%)	$\chi_{cf}$ (%)
Pur PLA	129,3 ± 1,8	8,2 ± 2,7	154,4 ± 0,2		9,49±2,8	60,1±0,7	1,4±0,1	10,4±3,1
PLA:Nano-2,4%	118,9 ± 0,9	26,7 ± 0,8	153,8 ± 1,2	158,2±1,3	28,5±0,2	61,5±1,8	2 ±1,1	31,3±0,3
PLA:Nebu-2,4%	129,5 ± 1,6	13,0 ± 1,0	156,0 ± 1,7		13,9±0,1	61,0±0,3	1,0±1,3	15,3±0,2
PLA:Com-2,4%	131,1 ± 0,7	12,4 ± 1,0	156,3 ± 0,5		12,9±0,5	61,1±1,6	0,6±0,6	14,2±0,5
PLA:Nano-10%	110,1±0,5	31,2±1,2	150,9±0,1	160,6±0,1	37,8±0,7	58,8±0,1	7,2±0,6	41,5±0,8
PLA:Nebu-10%	106,4±0,7	26,7±0,8	145,7±0,2	155,4±0,5	33,7±1,2	55,1±0,2	7,5±0,5	36,4±0,7
PLA:Com-10%	115,4±0,2	36,0±0,9	146,8±0,0	154,9±0,1	36,1±1,0	56,2±0,8	0,2±0,1	39,6±1,1

Par ailleurs, tous les composites de PLA à 10% de charges et le PLA:Nano-2,4% présentent deux pics endothermiques de fusion alors que le PLA Pur, PLA:Nebu-2,4% et PLA:Com-2,4% n'en présentent qu'un seul. Plusieurs raisons peuvent expliquer l'apparition d'un double pic de fusion [162–164] :

- la fusion de deux structures cristallines distinctes coexistantes ( $\alpha$  et  $\beta$ ),
- la fusion, au sein de la même structure cristalline, de deux populations de cristaux de taille et perfection différente,
- à un phénomène de fusion – recristallisation – fusion induit par la formation d'une première structure cristalline instable qui fond à plus basse température (1er pic de fusion) suivie d'une cristallisation d'une deuxième structure cristalline plus parfaite et stable qui fond à plus haute température (2ème pic).

Stoclet (2009) a étudié la structure cristalline du PLA après extrusion, par DRX et seule la forme  $\alpha$  apparaît, ce qui élimine la possibilité d'un polymorphisme [164]. De nombreux auteurs ont montré que l'apparition d'un double pic de fusion pour le PLA est liée uniquement à la troisième hypothèse, fusion-recristallisation-fusion [147,162,165]. Yasuniwa *et al.* (2004) ont étudié l'évolution de ce double pic pour le PLA seul, en fonction des vitesses de chauffe et de refroidissement [147]. Selon ces auteurs se sont deux paramètres qui influencent fortement l'apparition ou non du double pic. Ils ont constaté par exemple qu'une vitesse de refroidissement très rapide favorise la génération de cristaux imparfaits et qu'une vitesse de chauffe très rapide ne donne lieu qu'à un seul pic de fusion attribué à cette famille de cristaux imparfaits. La cinétique de cristallisation étant lente comparée à la cinétique de fusion, la recristallisation ne peut pas avoir lieu.

La compétition entre ces deux phénomènes de fusion et recristallisation ne permet pas la visualisation du pic de recristallisation qui se trouve confondu avec le pic de fusion à cause des vitesses de chauffe relativement rapides. Pour cette raison, une analyse en DSC modulée a été réalisée afin de séparer le signal thermique réversible lié à la fusion et le signal irréversible lié à la cristallisation Figure 70.



**Figure 70: Thermogrammes obtenus par DSC modulée en température du PLA:Nano-2,4% lors de la 2<sup>ème</sup> chauffe, à une amplitude de chauffe de 2°C min et une période de 60 s (en bleu, flux total ; en rouge, signal réversible ; en marron, signal irréversible)**

Sur le signal réversible du PLA:Nano-2,4%, on observe clairement deux pics de fusion et un épaulement sur le premier pic, sur la plage 140 - 160°C : le premier entre 140°-150°C qui est intense et le deuxième entre 150-160°C de plus faible intensité. Sur le signal non réversible, on observe un exotherme de cristallisation dans la région du premier pic de fusion observé sur le flux thermique total, suivi d'un pic endothermique de fusion qui semble être la continuité du deuxième pic observé sur le signal réversible. Le « cas idéal » aurait été d'observer seulement la cristallisation sur le signal non réversible et la fusion sur le signal réversible afin de mieux dissocier les deux phénomènes. Ceci est possiblement dû aux paramètres d'acquisition. En effet, suivant les caractéristiques moléculaire du polymère, la période d'oscillation définit une fenêtre favorable de telle sorte que l'on observe la fusion soit sur le signal réversible (si le temps d'oscillation est suffisamment long pour la fusion), soit sur le signal non réversible (s'il n'y a pas concordance entre la période et la longueur des chaînes). Dans notre cas, la deuxième fusion est répartie sur les deux signaux.

Tous les composites contenant 2,4% et 10% de charges présentent le même comportement en DSC modulée, en température. Cette étude montre donc que les doubles pics observés précédemment sur certains thermogrammes de la DSC classique sont liés à un phénomène de fusion-recristallisation-fusion lié à la perfection des cristaux formés lors de la cristallisation



froide ; même si un pic simple est observé pour les autres composites en cycle DSC standard, ce phénomène est bel et bien présent et identifiable en DSC modulée. Peurton et *al.* (2009) [162] et Gérard et *al.* (2013) [166] ont rapporté que ce phénomène est plus probable et plus marqué si l'écart entre la température de cristallisation froide et la température de fusion est important. Ce phénomène expliquerait l'apparition du double pic au sein des composites PLA:Nano-2,4% et PLA avec 10% de charges qui présente un écart de l'ordre de 35°C entre la cristallisation froide et la fusion ; puis son absence dans les matériaux PLA Pur, PLA:Com-2,4% et PLA:Nebu-2,4% qui présente un écart plus faible de l'ordre de 26°C.

Les taux de cristallinité finaux calculés par l'équation eq. 4 après la cristallisation froide des différents composites sont également présentés dans le Tableau 26. L'ajout du chitosane nanométrique à un taux de 2,4% augmente significativement le taux de cristallinité par rapport au PLA Pur (31,3% contre 10,4% pour le PLA) alors que ni le chitosane nébulisé ni le commercial ne semblent pas avoir d'effet significatif. L'augmentation du taux de charge à 10% augmente davantage le taux de cristallinité du PLA, qui devient équivalent pour le PLA:Nano et PLA:Com, 41,5 et 39,6% respectivement. Il faut rappeler que l'origine de cette augmentation du taux cristallinité est différente pour les différentes charges à 10%. En effet, le PLA:Nano-10% n'a pas subi de dégradation des chaînes de PLA en présence des charges ce qui suggère un effet nucléant des charges ; dans le cas de PLA:Com et PLA:Nebu, cette dégradation est importante et principalement responsable de l'augmentation du taux de cristallinité. L'augmentation importante du taux de cristallinité par l'ajout des nanocharges de chitosane au PLA, pourrait permettre d'éviter des traitements plus complexes mis en place pour atteindre des valeurs de taux de cristallinité importantes.

De plus, la comparaison des taux de cristallinité finaux lors de la première et la deuxième chauffe montre bien que le procédé d'extrusion-*cast* a un effet « positif » sur la cristallisation froide du PLA, en lien avec l'orientation des chaînes au cours du procédé. On note par exemple pour le PLA pur que le taux de cristallinité mesurée à la première chauffe est de 25,6% contre seulement 10,4% à la deuxième chauffe. Il faut aussi préciser que seulement dans le cas du PLA:Nano-10%, la valeur du taux de cristallinité initial  $\chi_{c0}$  n'est pas négligeable pendant les deux chauffes et cela avec une valeur similaire de l'ordre de 5%, qui suggère la présence de cristaux très stables thermiquement qui n'ont pas été fondus à 180°C ; cette hypothèse reste à vérifier.

### b. Cas des films composites à base de PHBV

La même étude en DSC a été réalisée sur le PHBV et ses composites (Figure 71). Contrairement au PLA, le PHBV possède une cinétique de cristallisation rapide qui explique l'apparition du pic exothermique lié à la cristallisation pendant le refroidissement. La transition vitreuse n'apparaît pas sur les thermogrammes ; elle se situe à des températures beaucoup plus basses (autour de 5°C selon le fournisseur) et n'apparaît donc pas dans le domaine de température étudié. Le Tableau 27 récapitule toutes les valeurs de températures caractéristiques et d'enthalpies pendant les deux montées en température et le refroidissement.

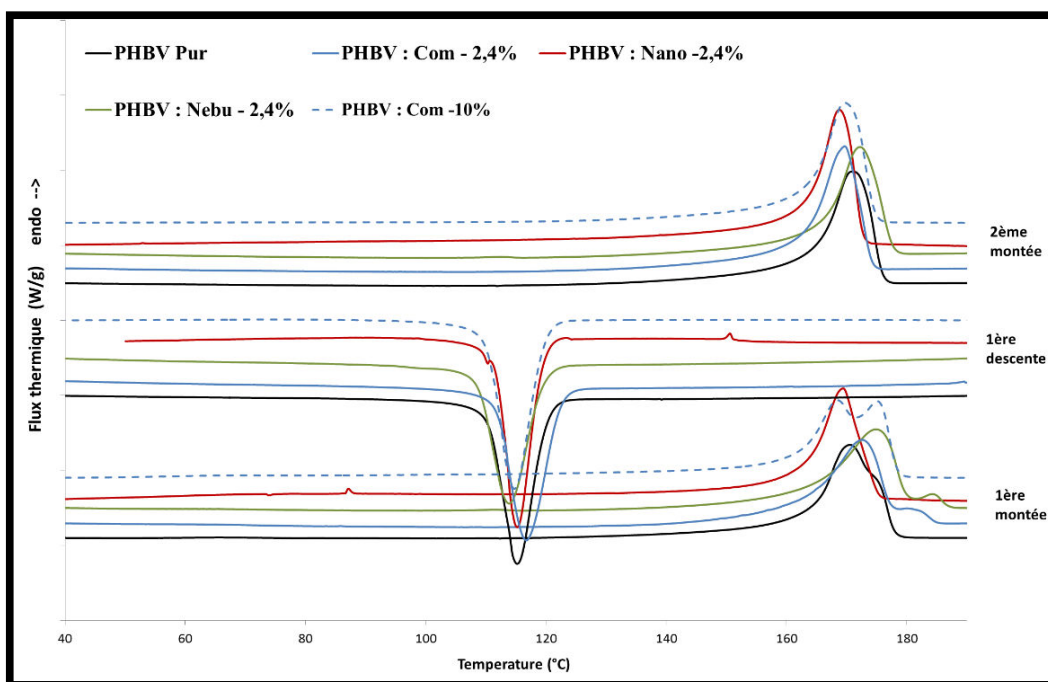


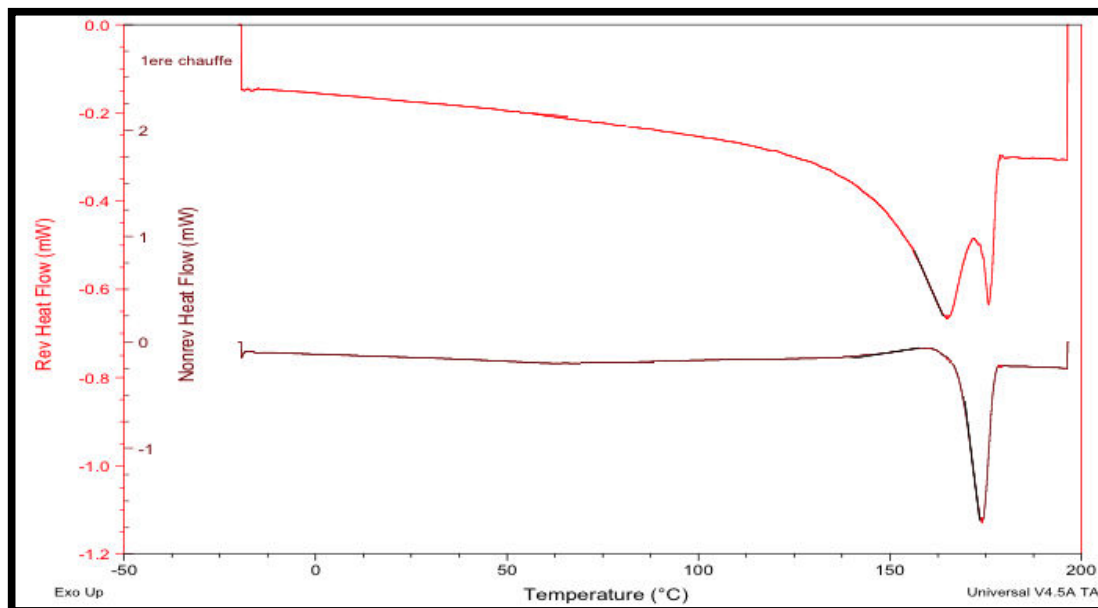
Figure 71: Thermogrammes enregistrés par DSC lors d'un cycle de température montée-descente-montée de 35 à 200°C pour « PHBV Pur », « PHBV:Com-2,4% », « PHBV:Nebu-2,4% », « PHBV:Nano-2,4% » et « PHBV:Com-10% »

#### i. Effet de la mise en œuvre

L'effet de la mise en œuvre est moins marqué que dans le cas des films composite à base de PHBV/chitosane. Les enthalpies de fusion à la première et la deuxième montée sont en effet très proches ce qui indique que le procédé d'extrusion-*cast* et les conditions de refroidissement (plus rapide dans le cas de l'extrusion) ont peu d'effet sur le taux de cristallinité. On constate cependant la disparition du deuxième pic de fusion à 175-183°C lors de la deuxième montée en température, qui suggère que des cristaux plus stables thermiquement avaient été formés lors du procédé d'extrusion-*cast* et que ces derniers ne se sont pas reformés dans les conditions standards de refroidissement à 10°C/min. On peut donc

penser que le procédé d'extrusion-*cast* et les vitesses de refroidissement plus rapides favorisent la germination et la cristallisation d'une fraction de cristaux plus parfaits et stables en lien avec l'organisation locale des chaînes générée durant le procédé d'extrusion.

Ce deuxième pic de fusion pourrait être aussi lié à un phénomène de fusion-recristallisation similaire à celui observé pour le PLA. Une analyse en DSC modulée a été réalisée afin de vérifier cette hypothèse (Figure 72).



**Figure 72 : Thermogrammes obtenus par DSC modulée en température du PHBV:Com-2,4% lors de la 1ère chauffe, à une amplitude de chauffe de 2°C min et une période de 60 s (en rouge, le signal réversible ; en marron, le signal irréversible)**

On voit bien la présence de deux pics de fusion bien distincts sur le signal réversible et, sur le signal non-réversible, la présence d'un faible pic exothermique dans la région du premier pic endothermique de fusion observé sur le thermogramme de la DSC classique. Ceci suggère que le phénomène de fusion-recristallisation reste ici mineur par rapport à l'effet du procédé extrusion-*cast* qui est donc principalement responsable de la formation de ces cristaux plus stables thermiquement.

#### *ii. Effet des particules de chitosane*

La présence du chitosane dans le PHBV, quels que soient le taux et le type de chitosane utilisé, n'affectent pas significativement la température de cristallisation. On observe cependant une légère augmentation du taux de cristallinité final du PHBV au fort taux de charge. Ikejima et Inoue (1999) ont étudié la cristallinité d'un mélange de polymère PHBV/chitosane préparé par mélange de solution (voir Chapitre I) [65]. Ils ont observé une

diminution du taux de cristallinité avec l'augmentation de la fraction de chitosane. Ils ont expliqué cette baisse de cristallinité par la présence des macromolécules rigides de chitosane autour des molécules de PHBV qui réduit la mobilité de ces dernières et inhibe la cristallisation. Dans notre cas, le mélange se fait par incorporation de charges de chitosane par voie fondue ; il n'y a donc pas de mélange intime des macromolécules de chitosane et de PHBV mais seulement des interactions à l'interface charge / matrice qui semblent avoir un effet limité sur la cristallisation, et qui explique donc l'absence de l'amorphisation observée par Inoue et Ikejima. Sur la base de ces résultats, les particules de chitosane ne semblent donc pas avoir un effet nucléant lors de la cristallisation de ce biopolyester comme c'était le cas pour le PLA : le PHBV non chargé avec le chitosane possède déjà une cristallinité très élevée ( $\chi_{cf} \sim 54\%$ ), probablement due à la présence d'agent nucléant dans le matériau commercial ; il est alors difficile de dépasser ce taux élevé par l'ajout des charges de chitosane.

**Tableau 27: Températures, enthalpies et taux de cristallinité obtenus pour les composites de PHBV durant les chauffes-refroidissement**

	1 <sup>ère</sup> chauffe				1 <sup>er</sup> refroidissement		2 <sup>ème</sup> chauffe		
	T <sub>fl</sub> (°C)	T <sub>f2</sub> (°C)	$\Delta H_f$ (J.g <sup>-1</sup> )	$\chi_{cf}$ (%)	T <sub>c</sub> (°C)	$\Delta H_c$ (J.g <sup>-1</sup> )	T <sub>fl</sub> (°C)	$\Delta H_f$ (J.g <sup>-1</sup> )	$\chi_{cf}$ (%)
PHBV Pur	170,7±0,1	175,4±0,0	77,1±0,4	52,9±0,3	115,4±0,2	82,6±0,6	170,9±0,1	78,4±1,6	53,7±1,1
PHBV:Nebu-2,4%	173,5±1,5	183,2±1,3	79,9±0,1	54,7±0,1	113,2±0,6	77,6±0,7	170,2±1,5	78,7±0,3	53,9±0,2
PHBV:Com-2,4%	172,8±0,2	182,5±0,2	82,4±1,1	56,5±0,7	116,2±0,5	83,8±0,2	170,0±0,3	81,2±0,6	55,6±0,4
PHBV:Nano-2,4%	169,7±0,3		73,8±0,7	50,5±0,5	115,6±0,4	79,7±0,3	170,6±1,8	79,7±0,2	54,6±0,1
PHBV:Com-10%	167,9*	174,9±0,3	82,1±0,6	56,2±0,4	114,8±0,1	85,1±0,2	169,7±0,0	84,8±0,7	58,1±0,5

\* Ce pic n'apparaît que sur un spectre des deux séries réalisées

Une analyse en StepScan a permis d'étudier les phénomènes de recristallisation–fusion lors de la deuxième montée, pour laquelle seul un pic de fusion apparaît. Les thermogrammes obtenus sont présentés dans la Figure 73. Les courbes des signaux irréversibles montrent la présence d'un pic exothermique situé entre deux pics endothermiques de fusion. Ces trois pics sont localisés dans la région du pic endothermique unique observé en DSC classique.

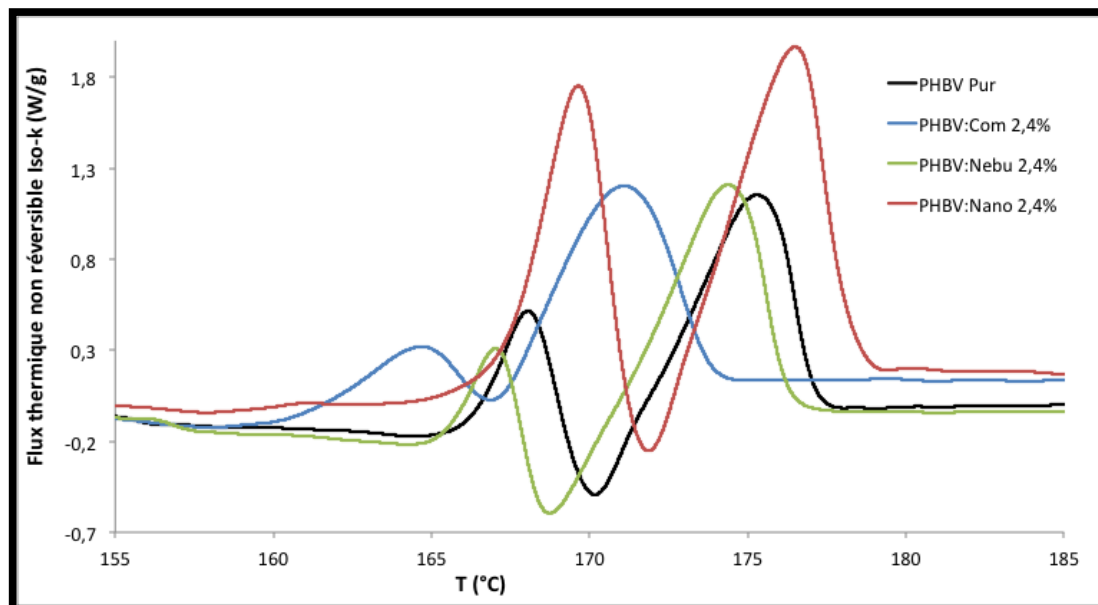


Figure 73: Courbes du signal non réversible obtenu par StepScan pour le PHBV Pur et ses composites à 2,4% de charges pendant la seconde chauffe (endo ↑)

Ce phénomène a aussi été observé lors de plusieurs études sur le PHB [65,105,166]. Gunaratne et Shanks (2005) ont étudié par *StepScan*, la fusion du PHBV en fonction du taux de HV utilisé [105]. Ils ont remarqué que la présence de HV réduit significativement le taux de cristallinité du biopolyester. De plus, ils ont trouvé qu'en présence de HV entre les lamelles de PHB, des cristaux instables thermiquement se forment et peuvent provoquer plusieurs fusion-recristallisation en fonction du taux de HV. Ce phénomène de recristallisation-fusion est donc bien présent dans le cas des films PHBV/chitosane et semble plus marqué dans le cas des charges nanométriques (SCASA).

## 2. Effet des particules de chitosane sur la cinétique et le mode de cristallisation isotherme du PLA et du PHBV

Pour évaluer l'effet des charges de chitosane sur la cinétique de cristallisation du PLA et du PHBV, plusieurs cycles isothermes ont été appliqués en partant toujours d'un état fondu du polymère avec une vitesse de refroidissement très rapide jusqu'à la température de cristallisation isotherme afin d'éviter toutes cristallisations prématurées. Dans cette partie de l'étude, nous nous intéressons à la cinétique de croissance des cristaux après l'activation du premier germe et non à la cinétique de germination de ces derniers. Ceci signifie que le temps considéré comme  $t=0$  correspond bien au début de la cristallisation lorsque les germes débutent leur croissance.

### a. Cas des films composites à base de PLA

Un exemple représentatif des thermogrammes enregistrés pendant la cristallisation isotherme du PLA à différentes températures est représenté sur la Figure 74. Tous les composites de PLA étudiés présentent une allure similaire et un temps de fin de cristallisation inférieur à 30 secondes.

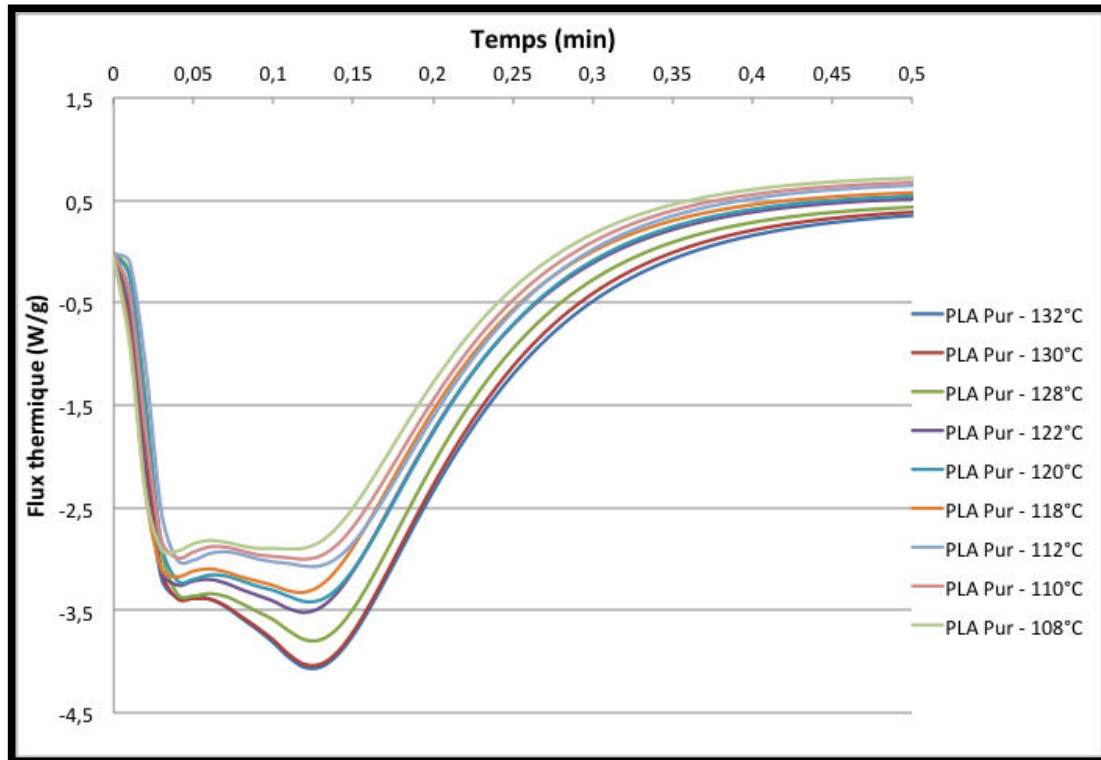


Figure 74: Pics exothermiques enregistrés lors de la cristallisation isotherme du PLA Pur à plusieurs températures de 108°C à 132°C (endo  $\uparrow$ )

#### i. Cinétique de cristallisation isotherme

En intégrant l'aire de ces pics, il est possible de déterminer l'évolution de la fraction volumique transformée en cristaux  $\alpha$  en fonction du temps (Figure 75). L'allure des courbes de  $\alpha$  montre effectivement une différence de cinétique de cristallisation entre les différents matériaux pour les différentes températures. Pour évaluer cette différence, un paramètre caractéristique est le temps de demi-transformation  $t_{1/2}$  : il représente le temps au bout duquel la transformation en cristaux a atteint 50% de sa valeur finale (Figure 76).

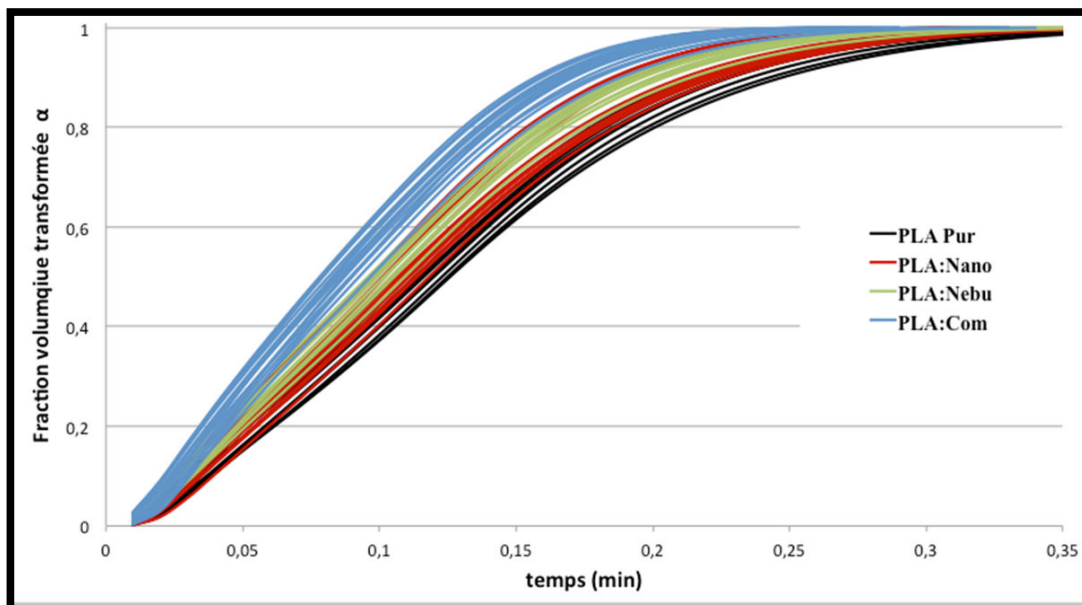


Figure 75: Evolution de la fraction volumique transformée en cristaux  $\alpha$  en fonction du temps pour le PLA pur et ses composites

Sur la plage de température étudiée, la température de cristallisation isotherme ne semble pas avoir un effet significatif sur le temps de demi-transformation quel que soit le type ou le taux de particules de chitosane utilisés. Pour pouvoir observer l'effet de la température sur la cinétique de cristallisation, il faudrait choisir une gamme de températures plus importantes. Cependant, un effet significatif de la présence des particules de chitosane dans le PLA est remarqué : les particules de chitosane réduisent le temps de demi-transformation et donc augmentent la vitesse de croissance des cristaux de PLA, d'autant plus quand le taux de charge augmente. On observe également un effet de la morphologie des particules sur la cinétique de cristallisation. On note en particulier que le chitosane commercial semble favoriser la vitesse de croissance des cristaux plus que le chitosane de taille nanométrique. Ceci peut être expliqué par l'état de dispersion des particules dans la matrice. En effet, malgré l'effet nucléant du chitosane nanométrique, observé précédemment, qui accélère l'activation des germes, la forte dispersion de ces particules fines et rigides dans la matrice (vu dans le paragraphe A.1 de ce chapitre) pourrait ralentir la croissance des germes formés. Ceci n'est pas le cas pour les larges particules de chitosane commercial qui laissent de vastes zones entre particules où la mobilité moléculaire des chaînes n'est pas impactée, facilitant ainsi la croissance des cristaux. Toutefois, dans le cas du chitosane commercial et qui plus est à 10% de taux de charge, il ne faut pas négliger la dégradation des chaînes de PLA explicitée plus haut (Tableau 25) qui est également à l'origine de cette vitesse de cristallisation accélérée en comparaison avec le PLA chargé de 10% de chitosane nanométrique

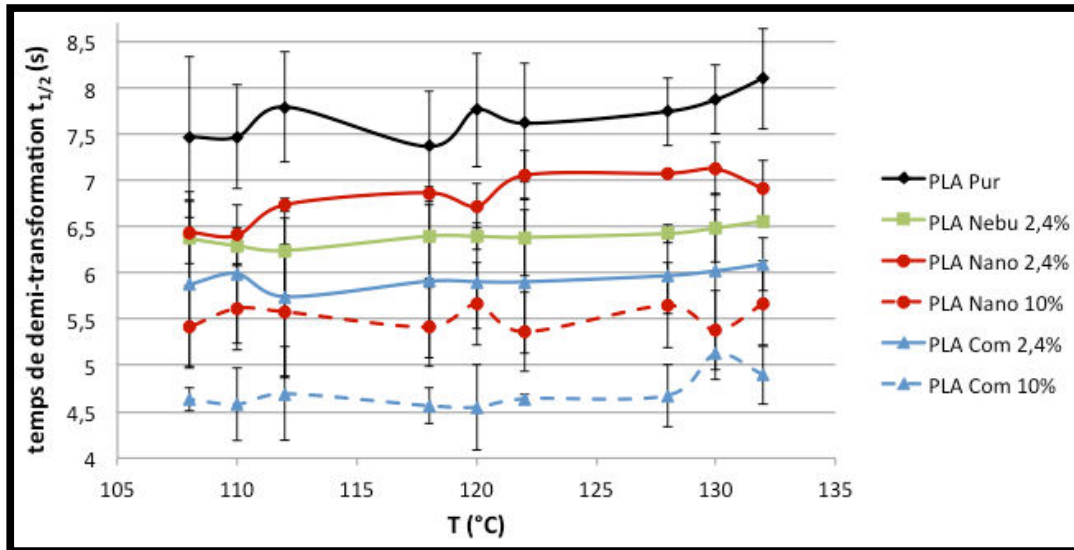


Figure 76 : Temps de demi-transformation  $t_{1/2}$  de PLA et de ses composites

ii. Mode de cristallisation isotherme

A partir de la fraction volumique transformée  $\alpha(t)$ , il est possible d'utiliser la forme simplifiée de la loi d'Avrami-Evans (eq. 7) pour avoir une première idée sur le mode de cristallisation.

$n$  est le coefficient d'Avrami qui donne une indication sur le mode (sporadique ou instantané) et la géométrie de croissance (bâtonnet, disque ou sphère) et  $k$  est la constante de vitesse de la transformation isotherme.

En linéarisant cette loi (eq. 8), il est possible d'obtenir les valeurs de  $n$  et  $k$  à partir du coefficient directeur et l'ordonnée à l'origine de la section linéaire des courbes de  $\ln[-\ln(1-\alpha(t))]$  en fonction de  $\ln(t)$  (Figure 77).



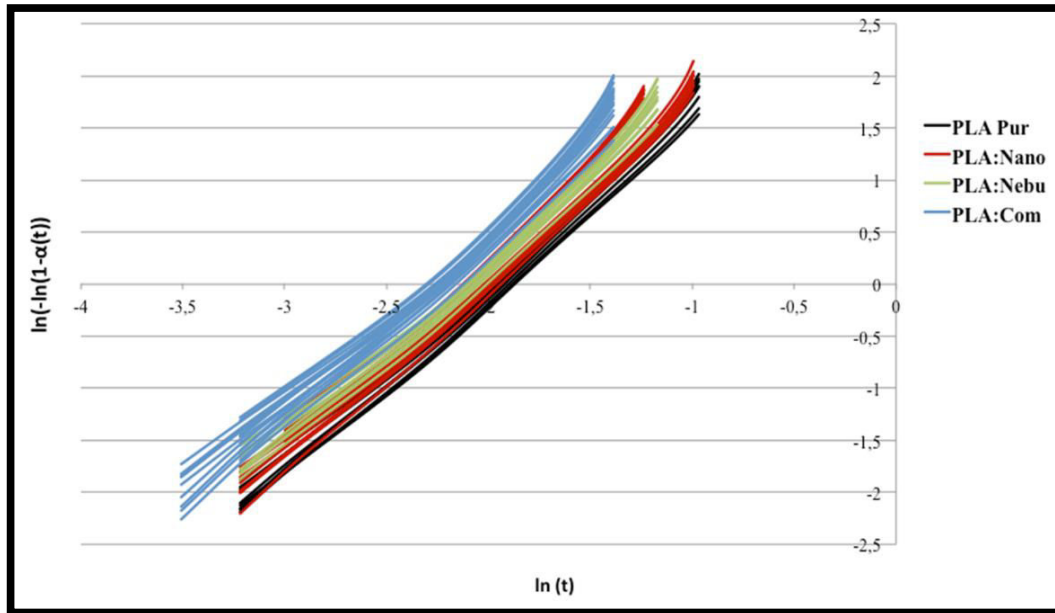


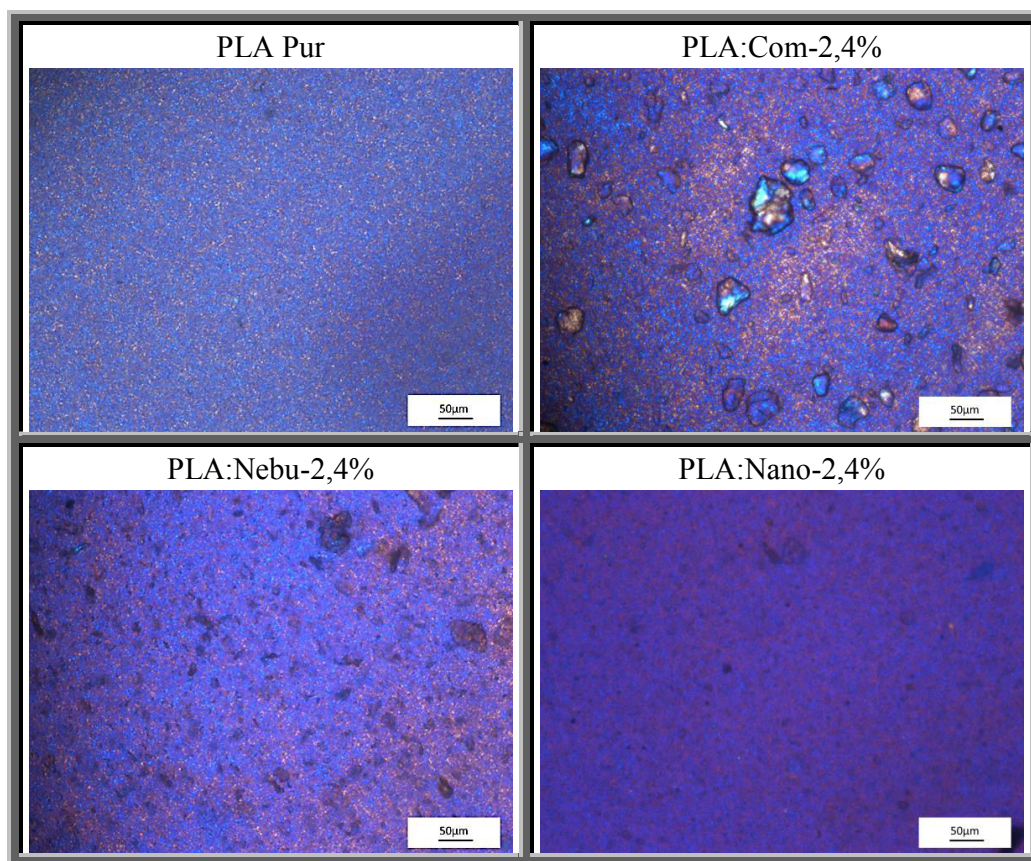
Figure 77: Sections linéaires des droites  $\ln(-\ln(1-\alpha(t)))$  obtenues pour le PLA Pur et ses composites

Les droites obtenues pour les différents composites sont parallèles et possèdent donc des coefficients directeurs similaires de l'ordre de 2. Ceci signifie que les charges de chitosane, quel que soit le type ou le taux, n'impactent pas le mode de croissance des cristaux du PLA. Cependant, on note une différence significative au niveau de la constante de vitesse de transformation  $k$  (différence importante au niveau de l'ordonnée à l'origine). Les valeurs de ces deux paramètres pour les différents matériaux sont regroupées dans le Tableau 28.

Tableau 28: Constantes d'Avrami  $n$  et de vitesse de transformation  $k$  pour le PLA et ses composites

T(°C)	132	130	128	122	120	118	112	110	108
<b>n</b>									
PLA Pur	1,8±0,1	1,7±0,0	1,8±0,0	1,7±0,0	1,8±0,0	1,7±0,0	1,9±0,0	1,8±0,0	1,8±0,1
PLA:Nano-2,4%	1,7±0,1	1,9±0,1	1,8±0,0	1,9±0,1	1,8±0,1	1,9±0,1	1,9±0,1	1,8±0,1	1,8±0,0
PLA:Nano-10%	1,8±0,0	1,6±0,0	1,8±0,0	1,6±0,0	1,7±0,0	1,6±0,0	1,8±0,2	1,7±0,1	1,7±0,0
PLA:Nebu-2,4%	1,7±0,0	1,7±0,1	1,8±0,0	1,7±0,1	1,8±0,0	1,8±0,1	1,7±0,1	1,8±0,1	1,8±0,1
PLA:Com-2,4%	1,8±0,1	1,7±0,1	1,7±0,1	1,7±0,1	1,8±0,1	1,8±0,1	1,7±0,1	1,9±0,0	1,8±0,1
PLA:Com-10%	1,7±0,0	1,9±0,0	1,7±0,0	1,8±0,1	1,7±0,0	1,8±0,1	1,8±0,0	1,7±0,0	1,8±0,1
<b>k</b>									
PLA Pur	25± 1	26±1	28±3	29±2	31 ±2	29±3	34±2	31±4	34±1
PLA:Nano-2,4%	33±3	43±11	35±1	43±10	36±38	48±14	47±13	43±8	43±7
PLA:Nano-10%	52±5	42±5	51± 5	42±5	47±9	43±5	61±9	50±2	46±6
PLA:Nebu-2,4%	36±1	36±5	38±1	38±6	42±4	40±5	37±5	44±6	42±4
PLA:Com-2,4%	46±6	41±1	44±13	41±1	48±16	45±1	39±0	54±8	46±2
PLA:Com-10%	63±6	85±13	64±6	78±25	68±11	85±33	83±16	66±8	82±26

Dans le cas idéal, la constante d'Avrami  $n$  doit être une valeur entière. Ceci est rarement le cas en réalité. Dans notre cas, toutes les valeurs de la constante d'Avrami sont proches de 2. Selon la théorie d'Avrami, ceci correspond soit à une germination sporadique sous forme de bâtonnets où les germes sont activés tout au long de la cristallisation, soit à une germination instantanée sous forme de disque où les germes sont activés en même temps dès le début de la cristallisation. Une observation au microscope optique de la cristallisation isotherme à 120°C du PLA et de ses composites a été réalisée afin de visualiser le mode de cristallisation. Les clichés ont été enregistrés 150 secondes après le début de l'isotherme. Le dispositif ne permettant pas d'observer les cristaux à de plus forts grossissements (Figure 78), il est difficile de tirer des conclusions sur leurs aspects. On peut cependant penser que la germination instantanée sous forme de disque est le mode de croissance le plus probable, la germination sous forme de bâtonnets pour le PLA dans ces conditions standards de cristallisation n'étant pas décrite dans la littérature.



**Figure 78:** Clichés obtenus au microscope optique de la formation des cristaux lors d'une cristallisation isotherme à 120°C du PLA et ses composites à 2,4% de chitosane

Concernant la constante de vitesse de la transformation isotherme  $k$  obtenue à partir des courbes  $\ln[-\ln(1 - \alpha(t))]$  (Figure 79), elle augmente par l'ajout des charges de chitosane et est

généralement plus importante quand le taux de charge augmente, particulièrement dans le cas du chitosane commercial. Ceci est cohérent avec l'évolution du temps de demi-transformation déjà observée sur la Figure 76 et confirme donc l'augmentation de la vitesse de croissance des cristaux de PLA en présence des charges de chitosane, en particulier aux forts taux et pour le chitosane commercial. Il faut noter que ces valeurs de  $k$  « expérimentales » sont bien conformes avec les valeurs de  $k$  « théoriques » calculés directement à partir du temps de  $t_{1/2}$  par la relation eq. 9.

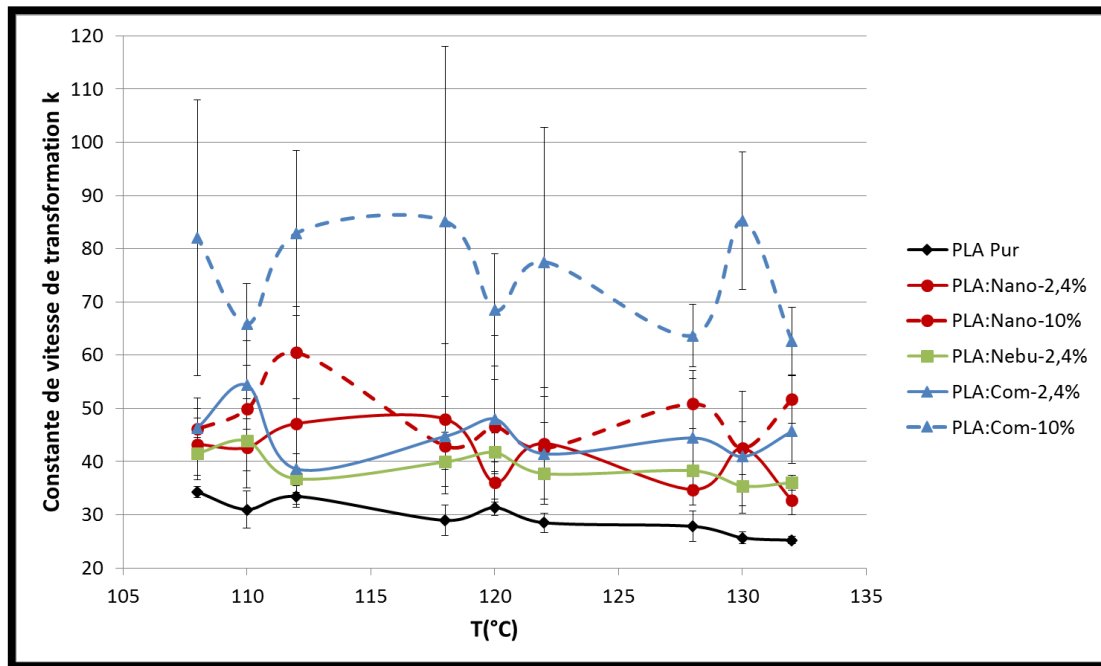


Figure 79 : Constantes de vitesse de transformation  $k$  en fonction de la température et du type de composite

### b. Cas des films composites à base de PHBV

Une étude identique a été réalisée sur le PHBV et ses composites à base de chitosane. Contrairement au PLA qui a cristallisé en une seule étape quelle que soit la température de cristallisation isotherme étudiée, le PHBV a montré plusieurs étapes de cristallisation, dont la durée diffère selon les températures et les échantillons, comme le montre les thermogrammes de la Figure 80. On constate notamment pour les températures de cristallisation comprises entre 122°C et 108°C, l'apparition plus tardive d'une seconde cristallisation (étapes 2 et 2 bis) bien distincte. Dans certains cas, surtout pour les basses températures (98°C, 100°C et 102°C), un chevauchement de deux pics exothermiques au niveau de l'étape 1 est observé (Figure 81) : dans ces cas, nous avons décidé de les considérer comme un seul pic principal pour simplifier l'étude.

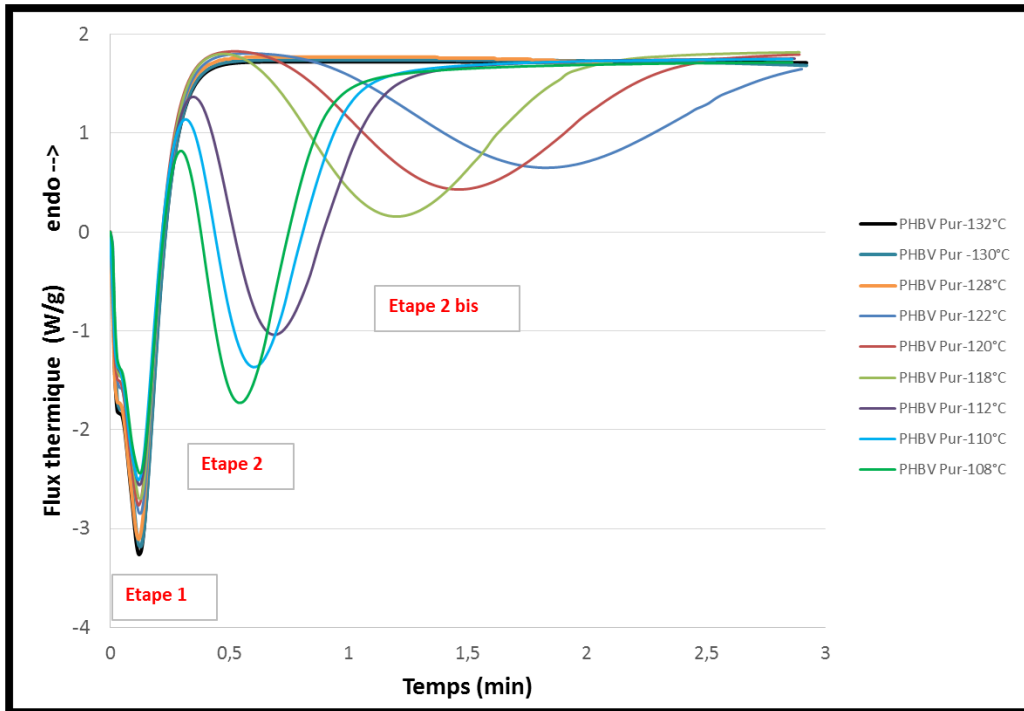


Figure 80: Pics exothermiques enregistrés lors de la cristallisation isotherme du PHBV Pur à plusieurs températures montrant les différentes étapes de cristallisation

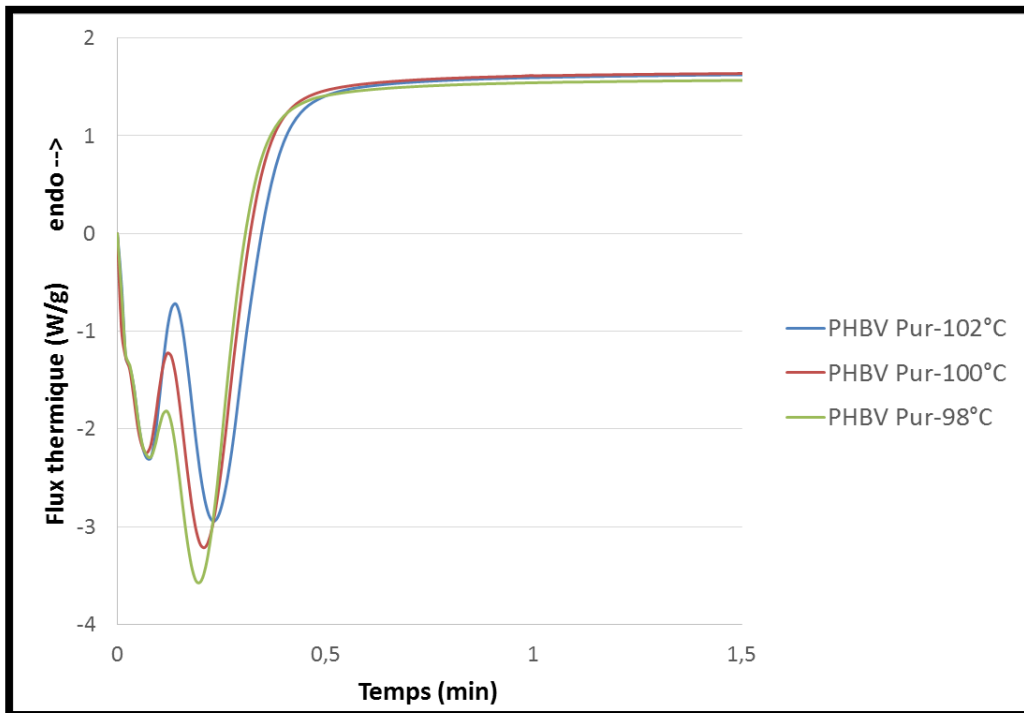


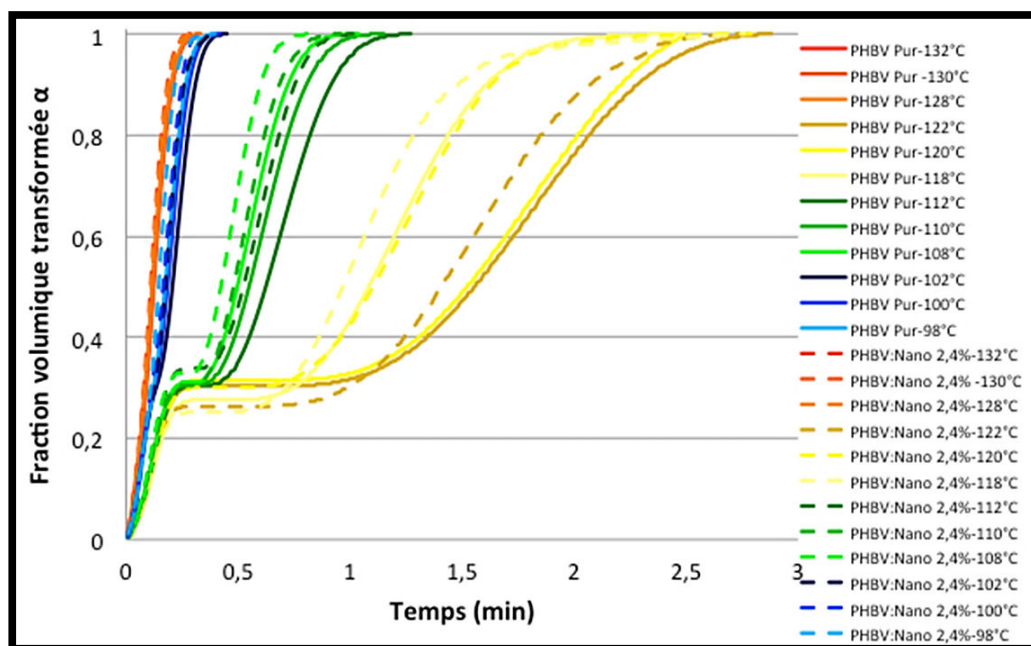
Figure 81: Pics exothermiques enregistrés lors de la cristallisation isotherme du PHBV Pur à 98°C, 100°C et 102°C

*i. Cinétique de cristallisation isotherme*

Comme dans le cas du PLA, la fraction volumique transformée en cristaux  $\alpha$ , les temps de demi-transformation  $t_{1/2}$ , les constantes de vitesse de transformation  $k$  et les constantes d'Avrami  $n$  sont déterminés pour chaque étape de cristallisation, pour toutes les températures et tous les composites.

Pour le calcul de  $\alpha$ , on considère que le volume total transformé en cristaux est la somme des volumes de toutes les étapes et que durant le temps inter-pics, la fraction transformée n'évolue pas.

La Figure 82 est un exemple représentatif de l'évolution de  $\alpha(t)$  en prenant en compte les différentes étapes de cristallisation. Cet exemple montre que c'est l'effet de la température qui est prépondérant sur la cinétique de cristallisation.



**Figure 82: Fraction volumique transformée en cristaux  $\alpha$  en fonction du temps pour le PHBV Pur et PHBV:Nano-2,4% illustrant une différence de cinétique de cristallisation**

Les temps de demi-transformation associés aux différentes courbes sont présentés sur la Figure 83. En prenant en considération les intervalles d'erreur, le temps de demi-transformation semble peu varier en fonction de la nature et de la concentration des charges, mise à part pour le PHBV:Com-2,4% et PHBV:Nebu-2,4% aux basses températures de cristallisation. Cette légère différence pourrait être expliquée par la mobilité moléculaire des chaînes qui est réduite à basse température mais qui est supérieure dans le cas des chitosanes commercial et nébulisé grâce aux larges surfaces disponible entre particules observées par

microscopie optique et aux masses moléculaires très réduites consécutives à la dégradation observée après extrusion par microscopie optique (cf. paragraphe I.A de ce chapitre). A hautes températures, les mobilités moléculaires sont plus élevées quel que soit le type de particules, ce qui explique les valeurs équivalentes de  $t_{1/2}$ .

L'influence de la température sur la cristallisation du PHBV est donc très marquée : les résultats obtenus montrent une cristallisation plus rapide pour les faibles et les hautes températures et une cristallisation près de 10 fois plus lente pour les températures entre 118 et 122°C. Ceci est possiblement lié au temps de latence entre les deux étapes de cristallisation, où la fraction volumique transformée n'évolue pas et qui est plus important pour ces températures. Pour supprimer l'effet de ce temps de latence, il serait éventuellement judicieux de traiter séparément les étapes de cristallisation en déterminant leurs temps  $t_{1/2}$  respectifs.

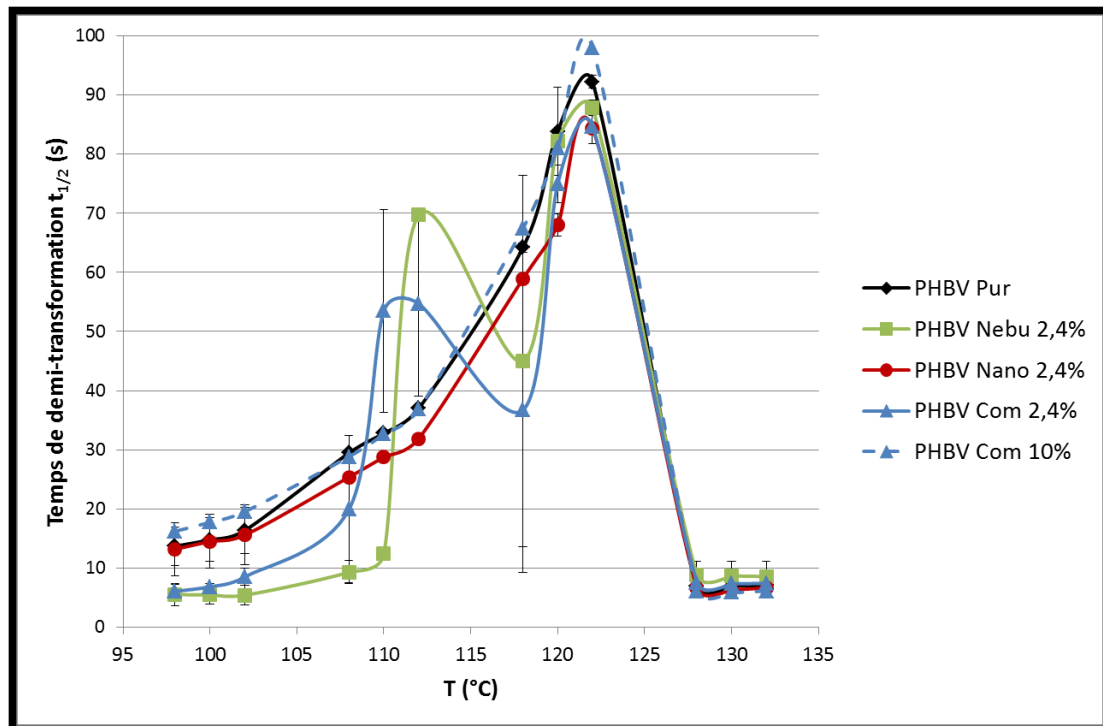


Figure 83: Temps de demi-transformation  $t_{1/2}$  de PHBV et de ses composites

### ii. Mode de cristallisation isotherme

En ce qui concerne la détermination du mode de cristallisation, la démarche a été appliquée sur chacune des étapes de cristallisation séparément.

#### • Etape 1

Après la linéarisation de la loi d'Avrami, il était difficile de déterminer la zone linéaire des courbes obtenues qui permet l'obtention des paramètres  $n$  et  $k$  comme le montre la Figure 84.

Les simplifications imposées au début de l'étude concernant le chevauchement des pics ont un impact direct sur l'aspect des courbes  $\ln[-\ln(1-\alpha(t))]$  : le chevauchement des pics provoque des zones d'inflexion importantes sur les courbes, surtout pour les basses températures, altérant ainsi leur linéarité. Pour définir cette section linéaire, nous avons fixé une valeur de coefficient de détermination  $R^2$  supérieure à 0,98 tout en respectant un nombre minimal de 20 points sur la section étudiée.

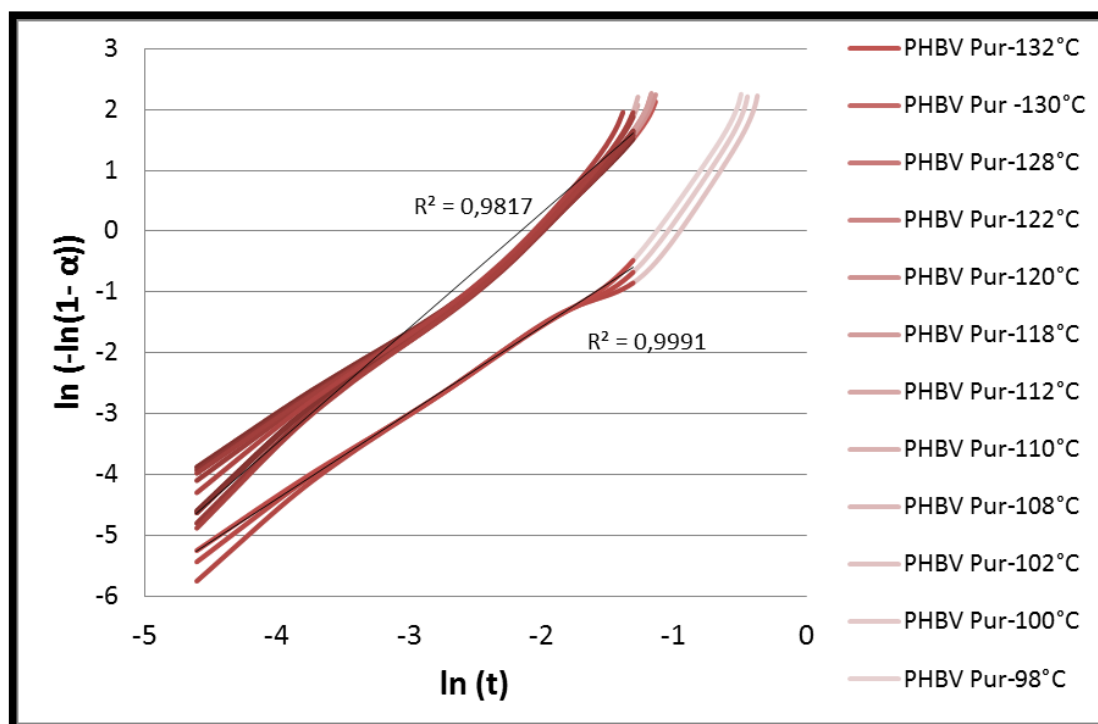


Figure 84: Courbes de  $\ln[-\ln(1-\alpha(t))]$  obtenues pour le PHBV Pur pour les différentes températures (en rose) et les sections considérées linéaires (en rouge)

Malgré cette restriction sur le choix de la partie linéaire, les incertitudes associées ont une influence significative sur les valeurs de  $n$  et  $k$ , comme le montrent la Figure 85 et la Figure 86 respectivement. Le PHBV Pur, PHBV:Com-2,4% et PHBV:Com-10% semblent avoir un mode de cristallisation identique autour de 2 pour toutes les températures (en tenant compte des incertitudes sur les valeurs). Pour le PHBV:Nano-2,4% et PHBV:Nebu-2,4%, malgré la différence importante observée entre les valeurs moyennes de  $n$  et celles des trois autres matériaux, il est difficile d'affirmer une modification du mode de cristallisation, vu la largeur des intervalles d'incertitudes associés à ces deux composites. Des conclusions similaires peuvent être tirées pour la constante de vitesse de transformation  $k$ . Ces résultats suggèrent néanmoins une modification du mode de cristallisation vers une germination plus sporadique

(l'indice d'Avrami tend vers 3) en lien avec l'amélioration de la dispersion et l'augmentation de la surface spécifique des particules nanométriques et nébulisées.

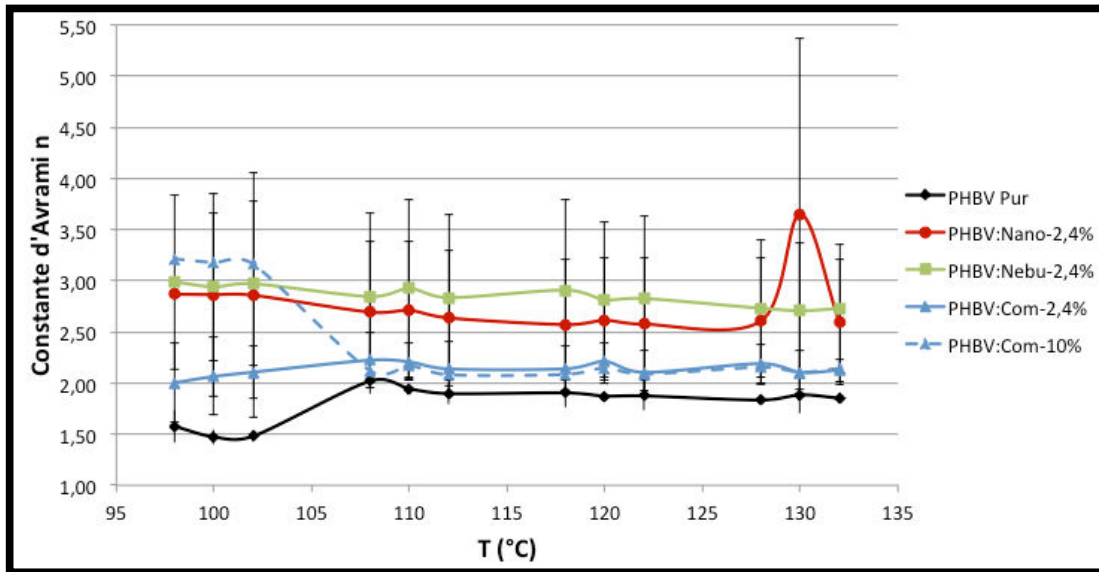


Figure 85 : Constante d'Avrami n en fonction de la température et de la formulation du composite de PHBV pendant la première étape de cristallisation

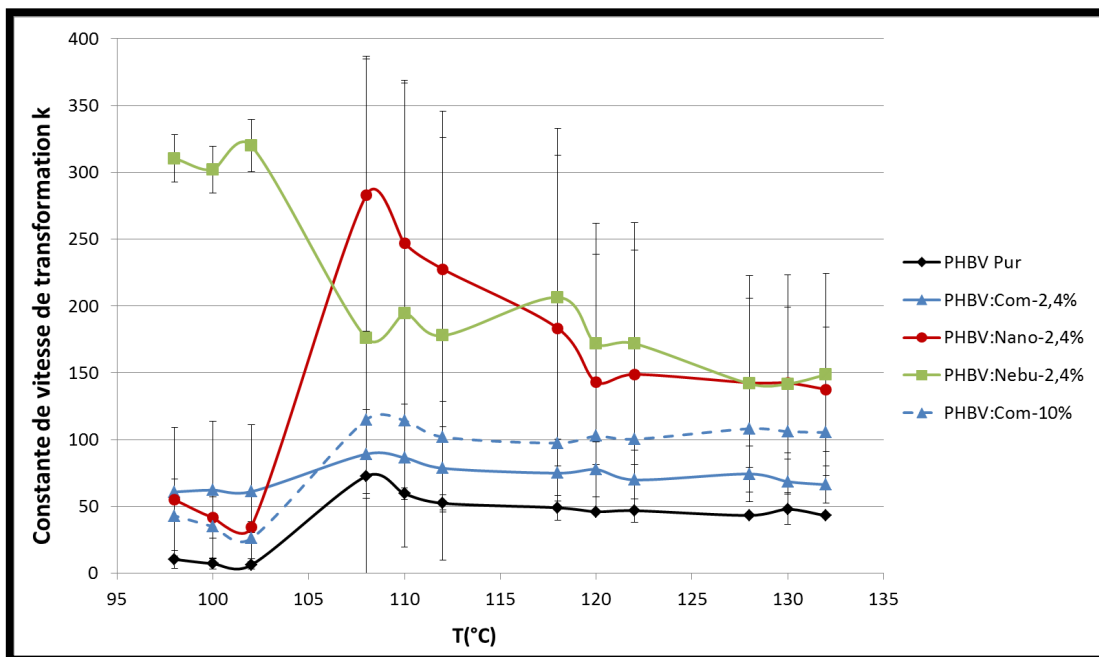


Figure 86 : Constante de vitesse de transformation k en fonction de la température et de la formulation du composite de PHBV pendant la première étape de cristallisation

- Etape 2

Pour la deuxième étape de cristallisation, on note un changement au niveau du mode de cristallisation  $n$  du PHBV et de ses composites qui passe clairement d'une valeur de 2 lors de la première étape de cristallisation à 3 pour cette seconde étape surtout pour les températures



supérieures à 118°C (Figure 87). Une explication de ce changement pourrait être la suivante : pendant la première étape de cristallisation (temps courts), une germination instantanée de mode 2 (géométrie de croissance en disques) a lieu ; pour les temps longs, cette germination est ralentie par la présence des cristaux et des particules de chitosane rigide, et se transforme en germination sporadique de mode 3 (disques) avec des cristaux qui croissent différemment en fonction de leur degré de liberté et de la mobilité moléculaire disponible.

Toutefois, De koning et *al.* (1993) ont signalé une seconde cristallisation du PHB après la mise en œuvre liée à la réorganisation des chaînes moléculaires pour rendre les cristaux plus stables [101]. La perfection cristalline pourrait alors être à l'origine de la deuxième étape de cristallisation observée dans notre cas.

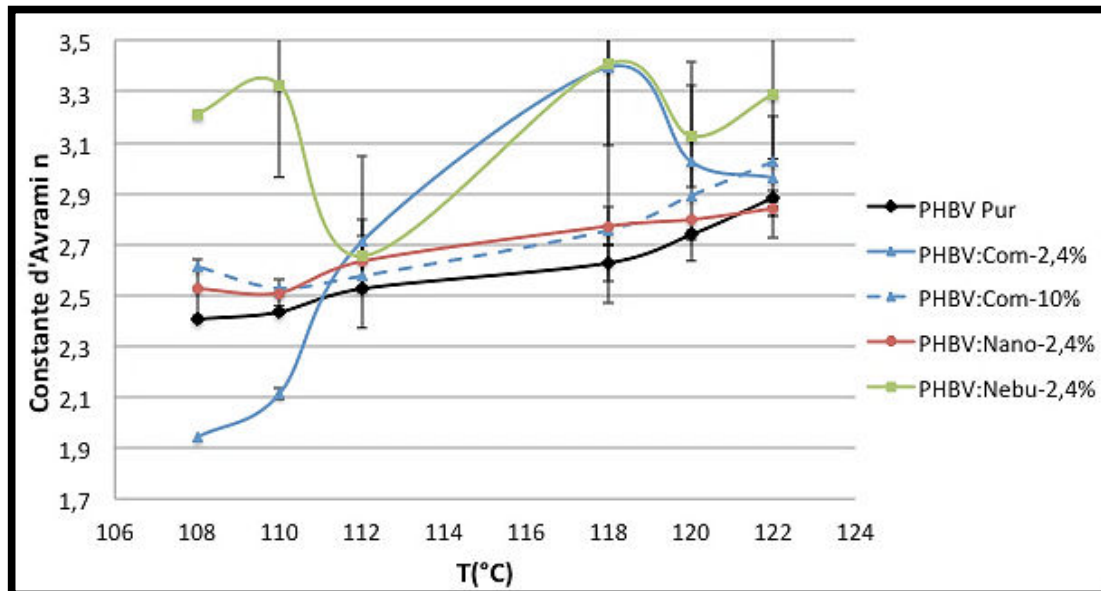


Figure 87 : Constantes d'Avrami  $n$  en fonction de la température et de la formulation du composite de PHBV pendant la deuxième étape de cristallisation

Les résultats de  $k$  consolident cette hypothèse (Figure 88) : à partir de 112°C, la constante de vitesse de transformation subit une baisse significative et devient presque négligeable.

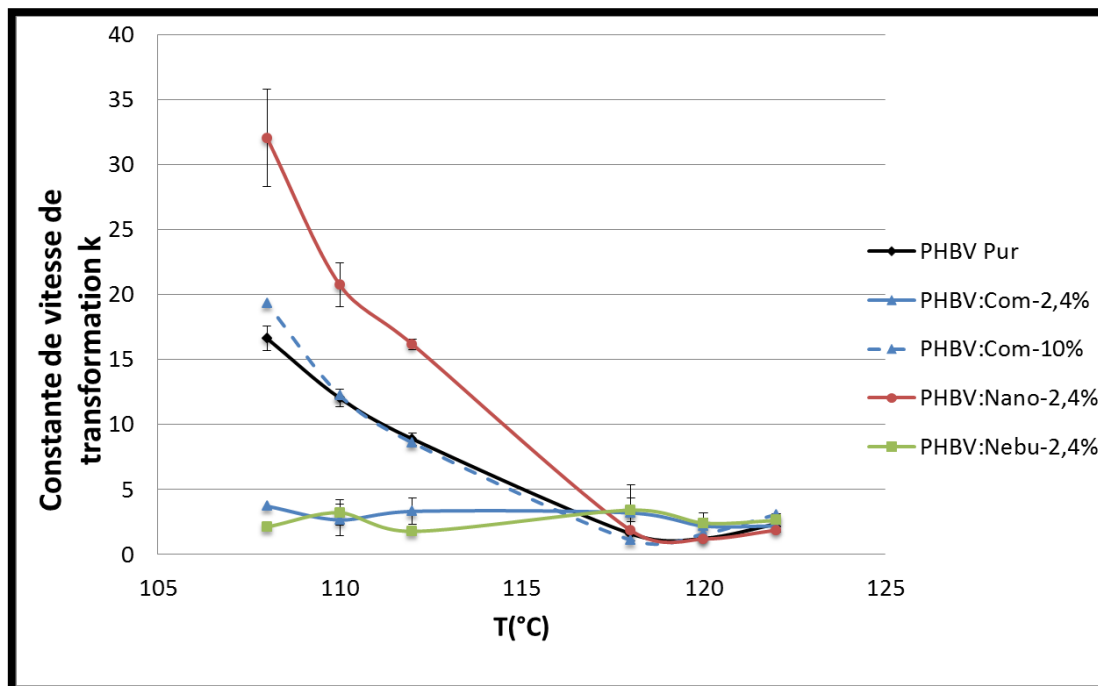


Figure 88 : Constantes de vitesse de transformation k en fonction de la température et de la formulation du composite de PHBV pendant la deuxième étape de cristallisation

## II. Etude des propriétés fonctionnelles du PLA, du PHBV et de leurs composites

Dans cette partie sont présentées, une étude sur la stabilité thermique des matériaux composites, et leurs propriétés thermomécaniques ainsi qu'une étude préliminaire sur leurs propriétés antibactériennes.

### A. Etude de la stabilité thermique du PLA, du PHBV et des composites

Une analyse thermogravimétrique a été réalisée pour évaluer l'effet de la présence des particules de chitosane, leur taille et leur concentration sur la stabilité thermique des deux matrices biopolyesters, PLA et PHBV.

#### 1. Cas des films composite à base de PLA

Sur les courbes d'ATG des différents composites à base de PLA, une perte de masse unique est observée dans la région d'analyse comprise entre 25 et 700 °C, excepté pour le « PLA:Nebu-10% » qui en présente deux, (Figure 89). Cette perte de masse correspond à la dégradation thermique du matériau. Pour 2,4% de taux de charge, les composites contenant le chitosane nanométrique et le chitosane nébulisé subissent une dégradation similaire à celle du PLA Pur avec une température de pic de DTG autour de 372°C et une vitesse de

dégradation quasiment identique (Figure 90). Cependant, pour le « PLA:Com-2,4% », la dégradation débute et se termine à des températures significativement plus faibles avec une  $T_{pic}$  autour de 346°C et une vitesse de dégradation plus faible que les trois matériaux précédents.

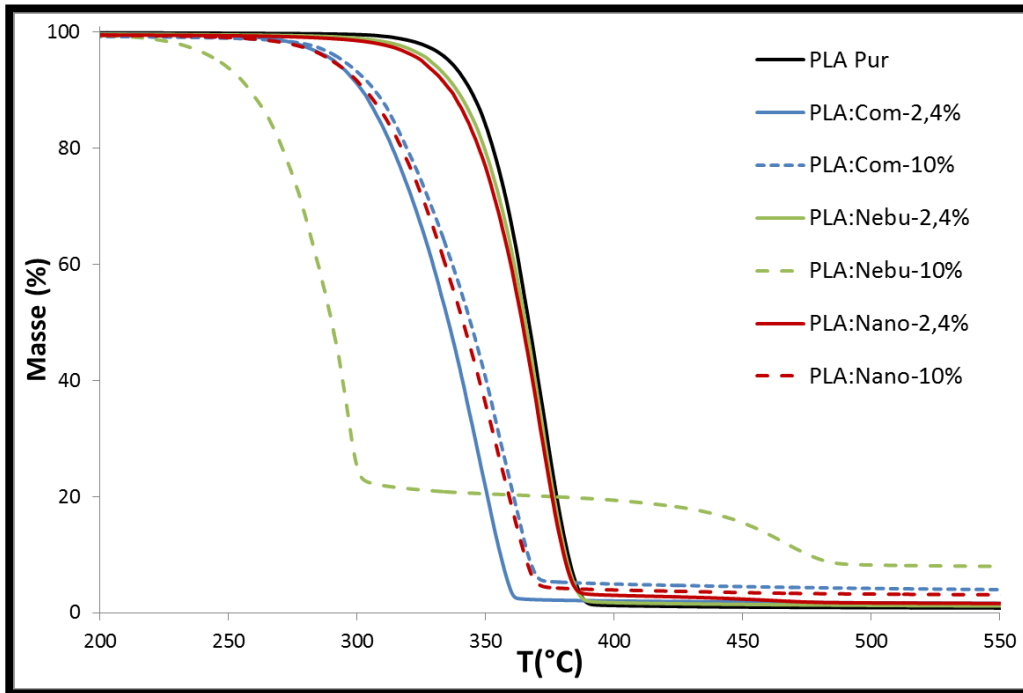


Figure 89: Courbes d'analyse thermogravimétrique des différents composites à base de PLA

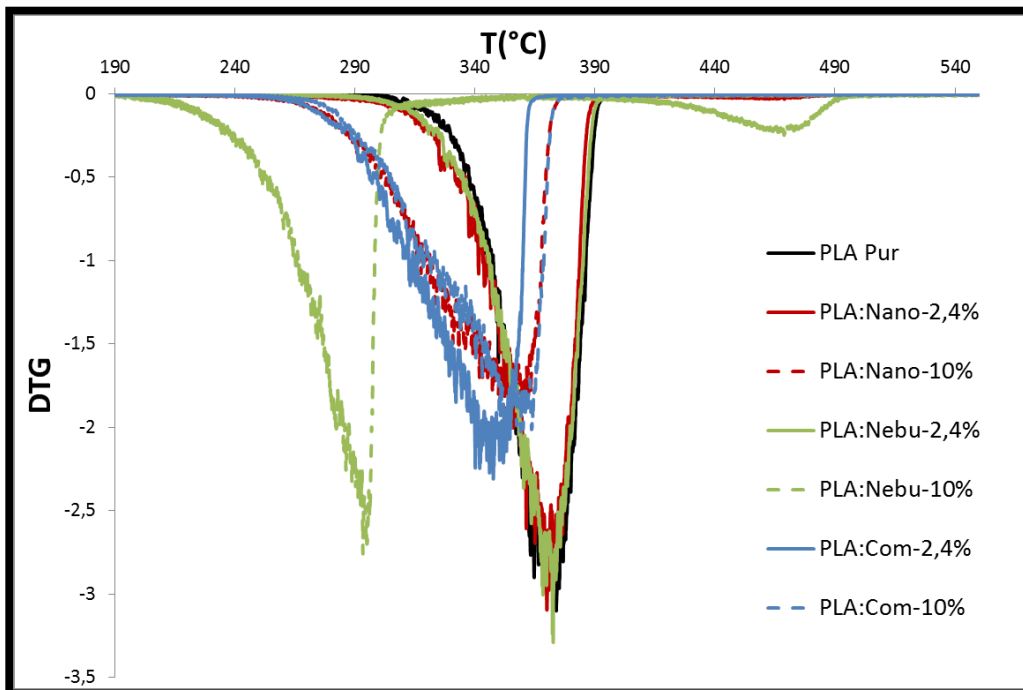


Figure 90: Courbes des dérivées DTG des différents composites à base de PLA

Lorsque l'on augmente le taux de charge à 10%, le PLA:Com-10% et le PLA:Nano-10% présentent une température de dégradation  $T_{pic}$  (357°C), largement inférieure à celle du PLA Pur, PLA:Nebu-2,4% et PLA:Nano-2,4% mais légèrement supérieure au PLA:Com-2,4%. La vitesse de dégradation de ces deux composites est plus faible que celle des autres composites avec une plage de dégradation plus large. Dans le cas particulier du PLA:Nebu-10%, deux pertes de masse ont été observé dans la zone d'analyse correspondant à deux dégradations : la première dégradation (environ 80% de perte de masse) est rapide et située à une température significativement plus basse que pour les autres composites ( $T_{pic}$  à 295°C) suivi d'une deuxième dégradation très lente aux plus hautes températures ( $T_{pic}$  à 465°C). Toutes les valeurs de température de dégradation sont récapitulées dans le Tableau 29.

**Tableau 29: Températures des pics de dégradation thermique sur les DTG des différents composites à base de PLA**

	PLA Pur	PLA:Com		PLA:Nebu		PLA:Nano	
Taux de charge (%)	0	2,4	10	2,4	10	2,4	10
$T_{pic}$ de dégradation (°C)	372	346	357	372	295 et 465	372	357

Bonilla et *al.* (2013) ont également noté une seule perte de masse pour des composites de PLA/chitosane pour deux taux de charge de 5 et 10% et pour deux tailles de particules (715 et 180  $\mu$ m, obtenues par broyage) [64]. Ils ont aussi remarqué une réduction significative de la vitesse de dégradation avec les particules de taille élevée à faible taux de charge. Néanmoins, ils n'ont pas observé d'impact significatif des particules sur les températures de dégradation du PLA. Ils n'ont fourni aucune explication concernant ces phénomènes.

Pour essayer d'expliquer ces phénomènes observés, plusieurs hypothèses peuvent être émises : la présence du chitosane, qui se dégrade à une température autour de 250-300°C (cf. Chapitre III) pourrait expliquer la dégradation précoce des composites chargés à 10% ; toutefois, ceci n'est pas en accord avec les résultats de Bonilla et *al.* (2013) sur la conservation de la température de dégradation et n'explique pas la dégradation prématurée du « PLA:Com-2,4% » dans cette même zone de température. Une deuxième explication pourrait être liée à des interactions défavorables à hautes températures entre les charges et la matrice qui catalyseraient le phénomène de dégradation. Cependant cette seconde hypothèse n'est pas cohérente avec les surfaces de contact associées : en effet, les interactions seraient plus importantes dans le cas des particules présentant des surfaces spécifiques importantes, en l'occurrence dans notre cas avec les particules « nanométriques » et nébulisés; toutefois, les

spectres de dégradation ne montrent pas cette tendance vu que les composites PLA:Nano-2,4% et PLA:Nebu-2,4% sont ceux qui possèdent la température de dégradation la plus élevée par rapport au PLA:Com-2,4%. Une troisième raison serait la réduction significative des longueurs de chaînes (Tableau 25) par la présence des taux de charge élevés lors du procédé de la mise en œuvre du composite, qui abaisse la température de dégradation. Ceci n'est cependant pas en accord avec la mesure en GPC du PLA:Nano-10% qui a montré une conservation de la masse moléculaire après mise en œuvre. Une dernière hypothèse pourrait être la présence des résidus tels que les sels dans le chitosane nébulisé ou des impuretés dans le chitosane commercial (confirmé par COT dans le Chapitre III) et surtout de l'humidité, qui ont joué le rôle de catalyseur dans la dégradation des composites correspondants.

Aucune conclusion définitive ne peut être encore faite sur la (les) raison(s) précise(s) de ce comportement, elle pourrait être une combinaison de toutes ces hypothèses évoquées ci-dessus.

## **2. Cas des films composite à base de PHBV**

Dans le cas de PHBV, une dégradation franche et unique est observée pour le film pur et les films composites (Figure 91). Tous ces matériaux possèdent un profil de dégradation identique sauf le PHBV:Com-2,4% qui a une dégradation à plus basse température. Ce résultat est étonnant vu que le PHBV:Com-10% n'a pas subi cet effet. Ce résultat reste inexplicé. Ces résultats montrent donc que le chitosane n'a pas d'effet néfaste sur la stabilité thermique du PHBV et ce peu importe le taux ou le type de charges.

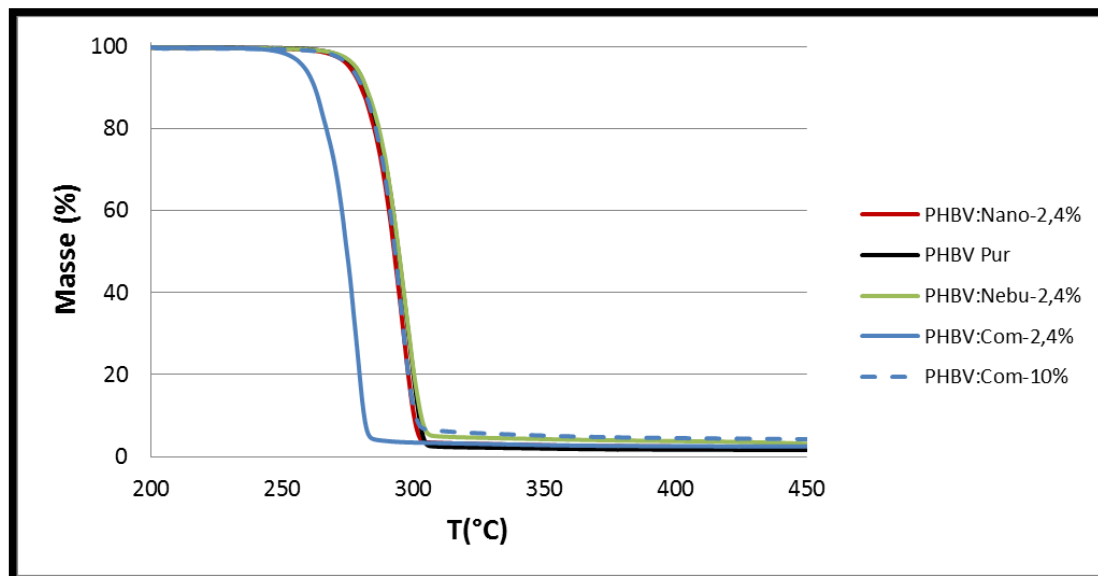


Figure 91: Courbes d'analyse thermogravimétrique des différents composites à base de PHBV

## B. Analyse thermomécanique

Dans cette étude, les résultats qui sont présentés concernent les composites à base de PLA. L'analyse n'a pas pu être réalisée sur les films de PHBV en raison de leur mauvaise planéité des films. En effet, à cause de la fluidité de la matière lors de l'extrusion-*cast* réalisée avec le microcompoundeur, il n'a pas été possible d'obtenir des films plats avec une épaisseur homogène; il n'était donc pas rigoureux de prélever des échantillons de ces films ondulés pour faire les analyses en DMA. Il serait judicieux d'envisager un nouveau grade de PHBV, mieux adapté à l'extrusion-*cast*, et qui permettrait ainsi une analyse plus précise et correcte.

Toutes les données relatives à l'analyse thermomécanique des films composites PLA/chitosane sont présentées dans le Tableau 30.

En général, à partir de la mesure thermomécanique en cisaillement sur les films composites, on note dans un premier temps une baisse du module de conservation viscoélastique  $G'$  à 35°C avec l'ajout des charges et cette baisse est plus importante quand le taux de charge augmente (Figure 92).

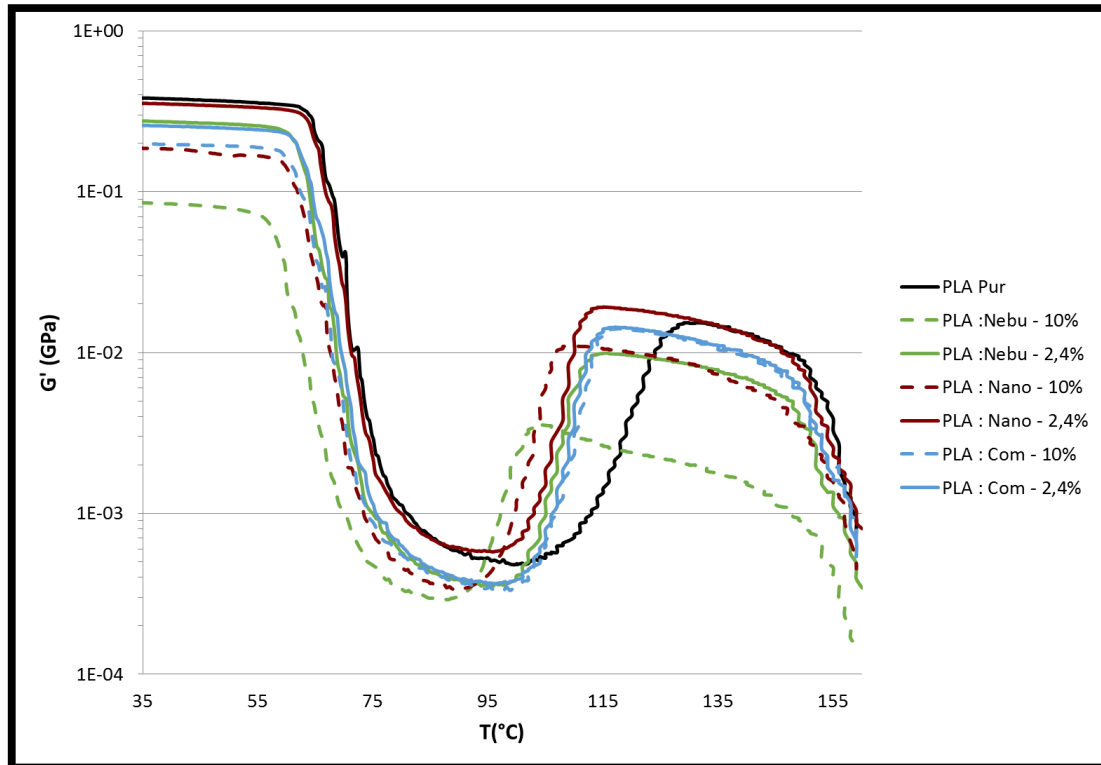


Figure 92: Module de conservation viscoélastique des différents composites à base de PLA

Ceci traduit une baisse de la rigidité du matériau en présence des charges, possiblement due à une mauvaise miscibilité entre les charges et la matrice induisant une mauvaise interface et cohésion. Cette mauvaise cohésion a été confirmée dans le cas du composite PLA:Com-2,4% par une observation MEB d'un faciès de rupture qui montre une zone vide entre la particule de chitosane et la matrice (Figure 93 (a)). Correlo et *al.* (2005) ont noté une diminution de la résistance maximale en traction et de la ductilité pour un mélange de polymère 50% PLA / 50% chitosane, qu'ils ont attribué à la mauvaise miscibilité et cohésion entre le chitosane et la matrice polyester [62]. Toutefois, le composite « PLA:Nano-2,4% » ne semble pas subir cette diminution du module ; ceci peut être dû à la taille réduite des particules et à la meilleure dispersion au sein de la matrice, qui réduit l'impact cette mauvaise interface à ce faible taux de charge. Lors de l'observation du faciès de rupture du « PLA:Nano-2,4% » (Figure 93(b)), il était difficile d'identifier les particules de chitosane « nanométriques » ou des zones creuses, qui pourrait être signe d'une rupture au niveau de la matrice et non à l'interface PLA/chitosane. Avec l'augmentation du taux de charge, les échantillons de PLA:Com-10% et PLA:Nano-10% présentent un comportement similaire à 35°C, probablement dû à l'agglomération des particules (Figure 94).

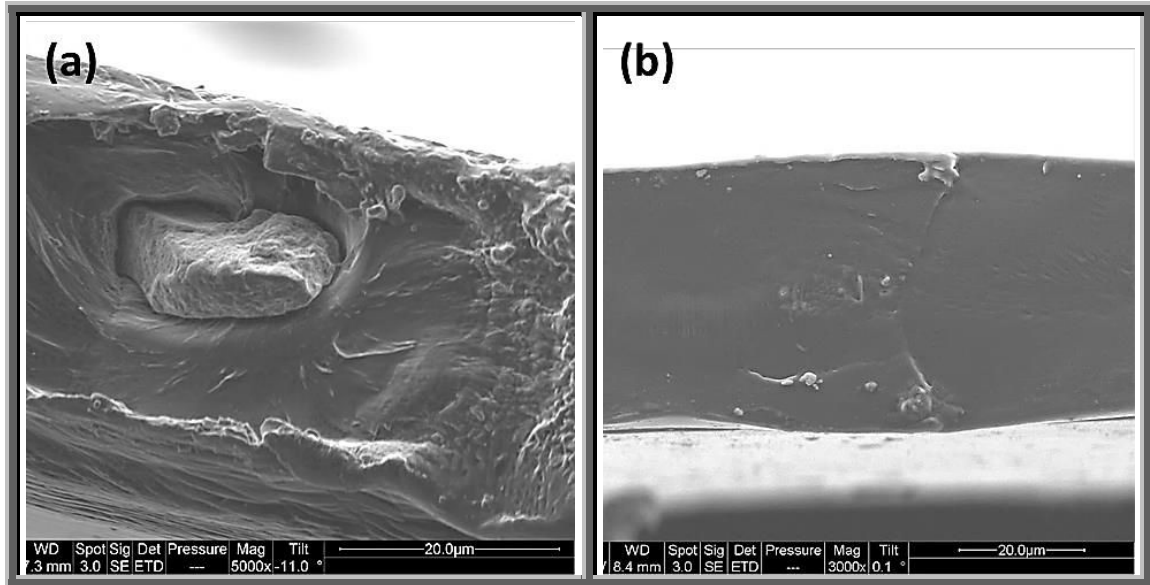


Figure 93: Cliché MEB d'un faciès de rupture des films composites (a) « PLA:Com-2,4% », (b) « PLA:Nano-2,4% »

La faible rigidité du PLA:Nebu-10% pourrait être expliqué, comme évoqué précédemment, par la réduction importante de la longueur des chaînes et la dégradation du matériau lors de la mise en œuvre due à la présence d'eau chimisorbée dans le chitosane nébulisé (cf. Chapitre III partie II) et la forte sensibilité du matériau à l'hydrolyse. Il faut noter que cet effet n'est pas très marqué dans le cas du PLA:Nebu-2,4% probablement dû au faible taux de charge utilisé.

Bonilla et *al.* (2013) ont noté une diminution significative du module élastique et de la contrainte maximale en traction par l'ajout des charges, montrant l'inexistence de l'effet renforçant du chitosane [64]. Ils ont aussi remarqué que la diminution de la taille des particules à faibles concentrations limite l'effet négatif des charges sur la rigidité de la matrice de PLA. A fort taux de charge, l'impact ne dépend plus de la taille, ce qu'ils ont expliqué par des phénomènes d'agglomération. Les résultats obtenus dans notre étude sont en cohérence avec ces observations.



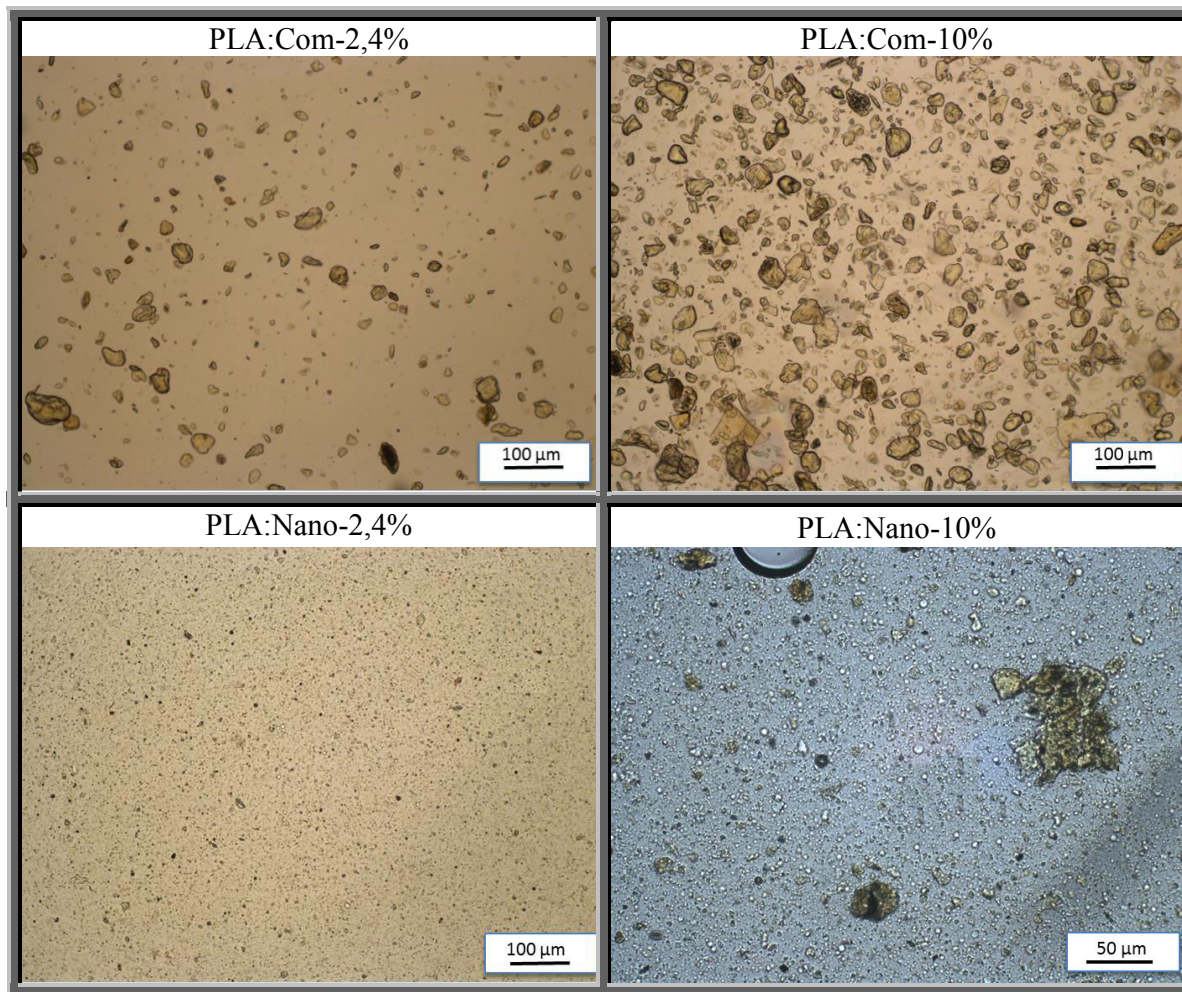


Figure 94 : Clichés des films PLA:Com et PLA:Nano à 2,4% et 10% de taux de charge montrant des phénomènes d'agglomération quand le taux de charge augmente

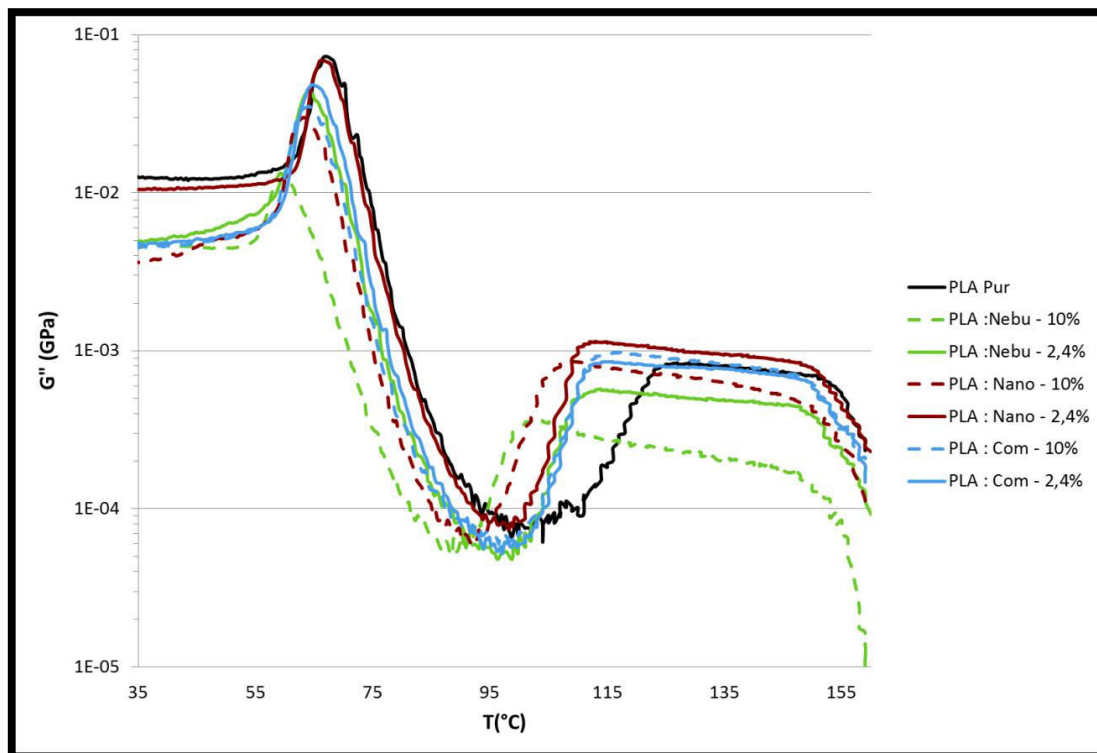
Dans un deuxième temps, il est important de noter l'augmentation de la valeur de  $G'$  dans la région comprise entre 90 et 135°C avant de s'écrouler autour de 150°C, et ce pour tous les composites, mais de façon plus lente pour le PLA Pur. Cette augmentation s'explique par la cristallisation froide du PLA qui a lieu dans cette plage de température et qui rend le matériau plus rigide. Il faut toutefois observer la différence entre les températures de début de cristallisation et la valeur de  $G'$  au plateau associée pour les différents matériaux. En effet, quels que soient le type et le taux de chitosane ajouté, la température de cristallisation froide  $T_{cc}$  est décalée vers des basses températures. Entre les différents composites, le composite « PLA:Nebu-10% » engendre la cristallisation froide la plus précoce à  $T_{cc} = 104^\circ\text{C}$  mais avec le module maximal  $G'_{max}$  le plus faible, suivi du « PLA:Nano-10% » à  $T_{cc} = 109^\circ\text{C}$  avec un module plus élevé que le précédent. A 2,4% de charges, ces deux composites présentent la même  $T_{cc}$  de 115°C mais avec un module  $G'_{max}$  deux fois plus élevé pour le « PLA:Nano-2,4% » que pour le « PLA:Nebu-2,4% ». Aucune différence significative n'a été

observée entre le « PLA:Com-10% » et le « PLA:Com-2,4% » qui ont une  $T_{cc}$  très légèrement décalée vers les plus basses températures par rapport au PLA Pur et un module  $G'_{max}$  équivalent. Ceci semble cohérent avec les résultats obtenus en GPC et les analyses DSC anisothermes : en effet, l'augmentation du taux de cristallinité par rapport au PLA pur dans le cas du PLA:Nano-10% et PLA:Com-10% pourrait expliquer la diminution de la différence entre la rigidité maximale du PLA Pur et ces deux composites à  $T_{cc}$  par rapport aux modules à 35°C. Il en est de même pour le « PLA:Nano-2,4% » où la cristallinité, trouvée supérieure à celle du PLA Pur, a engendré un matériau plus rigide en présence des charges autour de  $T_{cc}$ . La cristallinité du PLA:Nebu-2,4% et PLA:Com-2,4%, ayant la même valeur de cristallinité que le PLA Pur, n'a pas eu d'impact majeur sur la valeur de la rigidité maximale du matériau dans cette région, mise à part l'augmentation prématurée du module dans la zone de cristallisation froide en comparaison au PLA pur.

D'un point de vue général, le « PLA:Nano-2,4% » semble donc avoir les meilleurs comportements et rigidité et ce, sur une large plage de températures. Il favorise par ailleurs la reprise précoce de module du PLA lors de la cristallisation froide ce qui peut s'avérer très intéressant dans le cas de pièces qui nécessiteraient un recuit pour favoriser la cristallisation. Ceci pourrait cependant être une limitation dans le cas de barquettes de PLA thermoformée pour lesquelles on recherche une fluidité sur la plus large gamme possible de température afin de favoriser la mise en forme.

Concernant le module de perte  $G''$  qui représente la dissipation visqueuse (Figure 95), un comportement similaire à celui du module de conservation est observé : à 35°C, la présence des charges réduit le module de perte sauf dans le cas de PLA:Nano-2,4% qui reste similaire au PLA Pur.

Cependant, ce qui est intéressant à retenir des courbes de  $G''$  est l'importante augmentation du module visqueux qui a lieu entre 55 et 75°C. Cette augmentation représente une forte dissipation dans cette plage de température qui est liée au phénomène de relaxation principale que subit la fraction amorphe du matériau au-dessus de sa température de transition vitreuse (autour de 60°C) : en effet, à température ambiante, une certaine fraction de chaînes moléculaires est figée dans un état métastable mais dès le passage de la  $T_g$ , les chaînes moléculaires reprennent leur mobilité et changent de conformation provoquant ainsi une augmentation de la dissipation.



**Figure 95: Module de perte viscoélastique des composites à base de PLA**

Sur les courbes du facteur de perte  $\tan \delta$  (Figure 96), on observe un léger décalage du pic vers des basses températures avec l'augmentation du taux de charge, sauf pour le PLA:Nano-2,4% qui reste identique au PLA Pur. On note aussi une diminution de l'intensité du pic à 10% de charges et pour le PLA:Nebu-2,4%. Un deuxième pic de très faible intensité apparaît entre 95 et 125 °C lors de la cristallisation froide. Le décalage vers les basses températures pourrait être interprété par une augmentation de la mobilité moléculaire due à la réduction importante de la masse moléculaire lors de la dégradation des chaînes de PLA dans les composites à fort taux de charge. Cependant, la réduction de l'intensité du pic ne va pas dans le sens d'une réduction de mobilité. Des analyses complémentaires sur des PLA de différentes masses moléculaires permettraient éventuellement d'éclaircir les deux phénomènes observés.

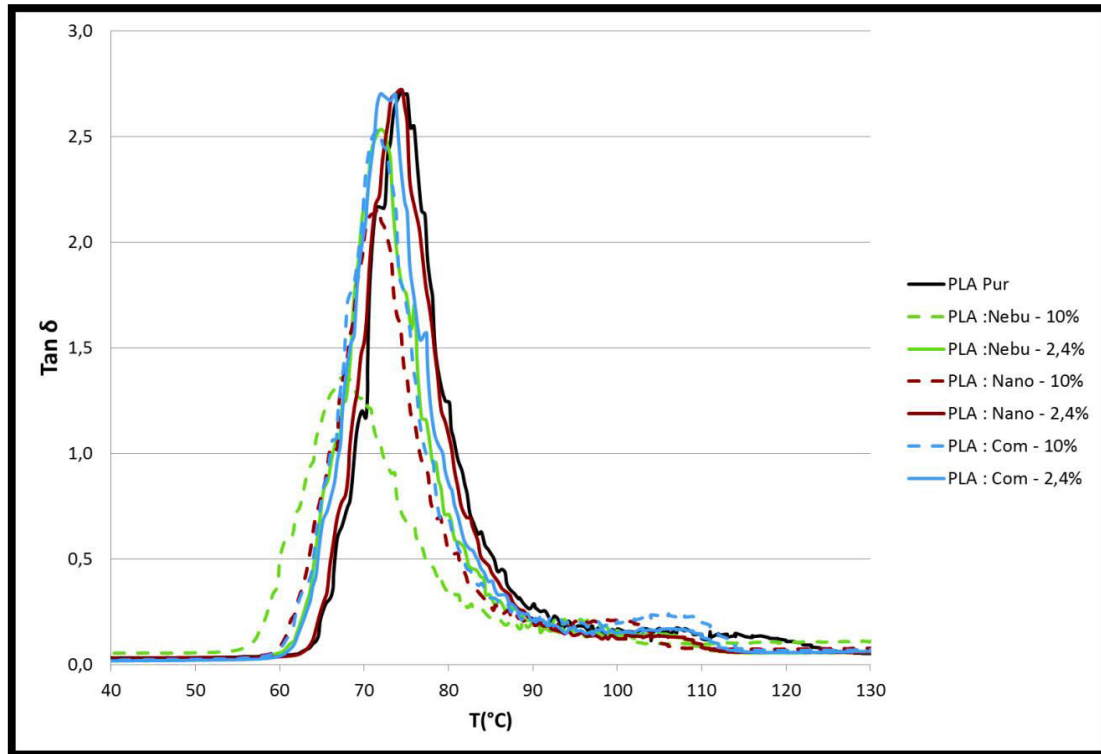


Figure 96: Facteur de perte des différents composites à base de PLA

Tableau 30: Modules viscoélastiques, facteur de perte viscoélastique et les températures associées pour les différents composites à base de PLA

	Initial à 35°C		À T <sub>cc</sub>				
	G' (GPa)	G''(Gpa)	T <sub>tan δ</sub> (°C)	tan δ	T <sub>cc</sub>	G' (GPa)	G'' (GPa)
PLA Pur	3,82.10 <sup>-1</sup>	1,25.10 <sup>-2</sup>	74,4	2,71	132	1,54.10 <sup>-2</sup>	1,54.10 <sup>-2</sup>
PLA:Com-2,4%	2,58.10 <sup>-1</sup>	4,73.10 <sup>-3</sup>	73,7	2,70	117	1,44.10 <sup>-2</sup>	1,44.10 <sup>-2</sup>
PLA:Com-10%	1,98.10 <sup>-1</sup>	4,51.10 <sup>-3</sup>	71,8	2,53	118	1,41.10 <sup>-2</sup>	1,41.10 <sup>-2</sup>
PLA:Nebu-2,4%	2,75.10 <sup>-1</sup>	4,96.10 <sup>-3</sup>	72	2,53	115	9,90.10 <sup>-3</sup>	9,90.10 <sup>-3</sup>
PLA:Nebu-10%	8,52.10 <sup>-2</sup>	4,71.10 <sup>-3</sup>	67,8	1,36	104	3,59.10 <sup>-3</sup>	3,59.10 <sup>-3</sup>
PLA:Nano-2,4%	3,54.10 <sup>-1</sup>	1,05.10 <sup>-2</sup>	74,2	2,72	115	1,92.10 <sup>-2</sup>	1,92.10 <sup>-2</sup>
PLA:Nano-10%	1,86.10 <sup>-1</sup>	3,63.10 <sup>-3</sup>	71,7	2,16	109	1,10.10 <sup>-2</sup>	1,10.10 <sup>-2</sup>

### C. Propriétés antibactériennes

Nombreuses sont les études réalisées pour étudier les propriétés antibactériennes du chitosane sous forme de membrane [46,167]. Il a été étudié en terme de composés bactériostatique/bactéricide pour contrôler la croissance d'un large spectre de bactéries (Gram positif et négatif). Malgré ceci, l'efficacité du chitosane comme agent antibactérien est encore mise en question : selon certains auteurs, cette bioactivité dépend directement des propriétés

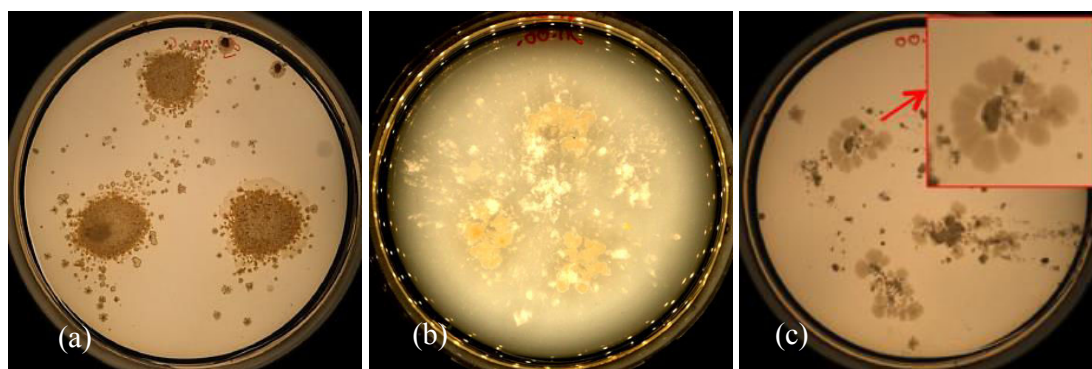
intrinsèques du chitosane, telles que le masse moléculaire, le degré d'acétylation et la pureté du produit [168].

Toutefois, très peu d'études ont été réalisées sur l'effet antibactérien du chitosane incorporé dans une matrice biopolyester. Bonilla et *al.* (2013) ont étudié les propriétés antibactériennes d'un composite à base de PLA, contenant 5 à 10% de particules de chitosane micrométriques. Le composite a été utilisé comme emballage de la viande de porc pendant 7 jours: ils ont observé une activité antibactérienne sur les bactéries aérobies de ces films composites en comparant le nombre de microorganismes présents sur la viande emballée par le film de PLA pur, le film de PLA/chitosane et la viande laissée à l'air.

Dans cette étude, l'objectif est d'observer la présence ou non d'un effet antibactérien des films PLA : chitosane et d'évaluer l'influence de la taille et du taux de chitosane présent sur la croissance des bactéries.

Il faut noter que ce qui est présenté par la suite ne représente que les essais préliminaires d'une étude qui sera poursuivie ultérieurement. Nous nous sommes limités à la mise en place de protocoles basiques et simples.

Le premier protocole consiste à placer des amas des différentes poudres de chitosane sur une gélose nutritive, sur lesquels sont rajoutées des gouttes de 25  $\mu$ L d'une suspension bactérienne d'*E. coli*. L'ensemble est placé dans l'incubateur à 37°C pendant 24h. Les résultats sont présentés sur la Figure 97.



**Figure 97: Résultats de la croissance bactérienne (*E. coli*) après l'application de la suspension bactérienne sur le tas de chitosane : (a) commercial, (b) nébulisé, (c) nanométrique.**

Ces résultats mettent en évidence un effet répulsif du chitosane nanométrique : on observe que les bactéries ont migré en dehors des amas de chitosane nanométrique et les colonies se sont développées sans aucun contact avec ce chitosane. En revanche, les chitosanes

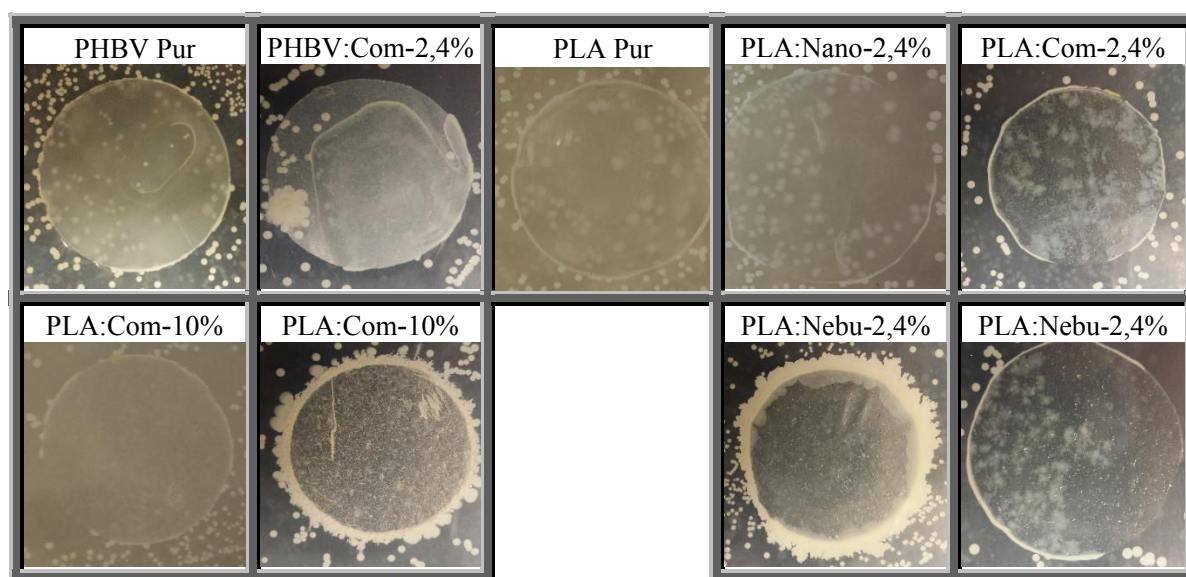
commercial et nébulisé n'ont pas eu d'effet similaire. Le mécanisme d'action du chitosane nanométrique n'a pas été étudié dans cette étude. On peut cependant émettre l'hypothèse que la plus grande surface spécifique des particules nanométriques a permis une meilleure diffusion du chitosane dans la gélose prévenant ainsi la croissance bactérienne. Kong et al. (2010) ont rapporté une influence de l'aspect physique des nanoparticules sur le mode d'action du chitosane : les particules ultrafines de chitosane peuvent pénétrer dans la cellule à travers la paroi cellulaire et altérer la transcription de l'ADN dans le cytosol alors que les plus larges nanoparticules interagissent avec la paroi cellulaire en formant une couche imperméable qui gêne le transfert de nutriments [167].

L'évidence d'un effet antibactérien des particules nanométriques seul a été observé. La deuxième phase d'essai consiste à évaluer la bioactivité des films composites.

Pour ce faire, deux protocoles ont été appliqués :

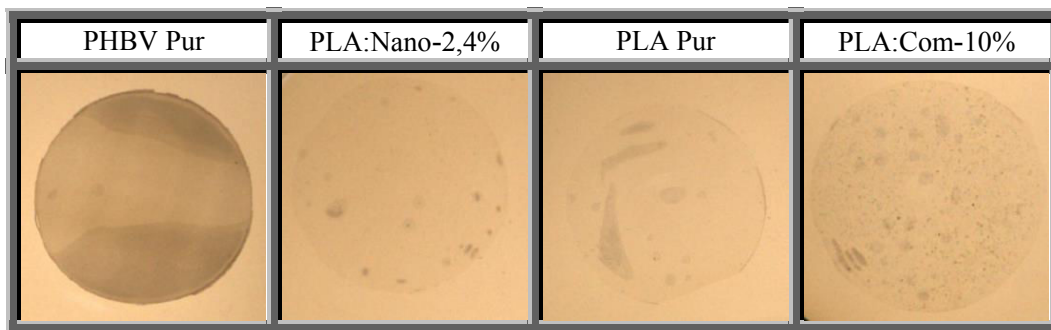
- Le premier consiste à étaler 25 $\mu$ L de la suspension bactérienne *E. coli* sur la gélose puis placer les films au-dessus. L'ensemble est mis à incuber pendant 24h à 37°C.

Les résultats de ce protocole ne montrent pas de différence significative entre les différents composites (Figure 98) : les bactéries ont formé des colonies à proximité de tous les films, même dans le cas des particules nanométriques. L'absence d'activité antibactérienne est probablement due à l'emprisonnement des particules de chitosane au sein des polyesters hydrophobes qui empêchent l'accessibilité réciproque des bactéries au contact du chitosane.



**Figure 98: Résultats de la croissance bactérienne (*E. coli*) : les films composites sont placés sur un pseudo-tapis bactérien**

- Le deuxième protocole, dérivé des deux premiers utilisés sur la poudre et sur le film : les films composites sont placés directement sur la gélose et une suspension bactérienne est placée uniquement sur les films sans contact avec la gélose. L'ensemble est placé dans l'incubateur pendant 24h à 37°C.



**Figure 99: Résultats de la croissance bactérienne (*E. coli*) : suspension bactérienne placée sur les films composites**

Ce protocole n'a malheureusement pas fourni de résultats concluant (Figure 99) : aucun développement bactérien n'a été observé. Les bactéries n'ont pas ici accès aux nutriments de la gélose et s'avèrent incapables de métaboliser ces matériaux, les bactéries ne se sont donc pas développées ou sont mortes par manque d'éléments nutritifs.

Pour pouvoir mieux évaluer l'éventuel pouvoir antibactérien de ces films composites, il faut surmonter ces obstacles : améliorer le contact entre le matériau et les bactéries tout en fournissant suffisamment d'éléments nutritifs pour prolonger la croissance bactérienne. Ceci fera l'objet d'une étude ultérieure.

Une piste possible serait d'améliorer la présence du chitosane en surface des films en favorisant sa migration à la surface lors du procédé de mise en forme ou en augmentant le taux de charge avec les limitations que cela comporte en terme de propriétés thermomécaniques comme vu dans le précédent chapitre ou encore en augmentant la porosité des films. Dans la littérature, il est indiqué que, le pouvoir antibactérien du chitosane est amélioré par des modifications chimiques [169,170], comme la présence d'éléments métalliques qui possèdent eux-même un effet antibactérien : comme l'argent, le cuivre, le zinc ... Cependant, la présence de ces métaux potentiellement toxiques n'est pas envisageable dans les domaines alimentaire et biomédical; l'utilisation du chitosane nanométrique pourrait éventuellement être une bonne alternative.

### **III. Conclusions sur l'élaboration et les propriétés des films composites PLA/chitosane et PHBV/chitosane**

- **Les nanoparticules de chitosane générées par le procédé SCASA sont mieux dispersées et réparties dans les films biopolyesters obtenus par extrusion-cast**

Toutes les particules de chitosane (commerciales, nébulisées et générées par le procédé SCASA) ont été dispersées avec succès dans les matrices biopolyesters par le procédé d'extrusion-cast.

Le procédé d'extrusion-cast n'a pas eu d'effet sur la taille des particules commerciales dont le diamètre médian reste compris entre 30 et 40  $\mu\text{m}$ , cependant, il a réduit d'une manière significative la taille des particules nébulisées ( $\sim 20\mu\text{m}$  au lieu de  $39\mu\text{m}$ ); ces deux types de particules sont facilement identifiables dans la matrice. Quant aux nanoparticules générées par le procédé SCASA, le procédé d'extrusion-cast a permis de désagréger correctement les agglomérats de ces nanoparticules (taille majoritaire  $\leq 2-3\mu\text{m}$  au lieu d'environ  $20\mu\text{m}$ ) qui deviennent difficilement identifiables dans les films composites.

La faible taille de ces particules nanométriques et leur surface spécifique importante ont permis une meilleure dispersion au sein de la matrice par rapport aux particules micrométriques commerciales et nébulisées.

- **Le procédé d'extrusion-cast favorise la germination et la croissance des sphérolites du PLA et du PHBV**

Le procédé d'extrusion a accéléré le début de la cristallisation froide du PLA et de ses composites, possiblement à cause de l'organisation locale des chaînes générée durant l'extrusion, qui a favorisé la germination et la croissance des sphérolites lors de la cristallisation et qui a augmenté le taux de cristallinité final du matériau.

Pour le PHBV, l'extrusion et les vitesses de refroidissement élevées favorisent la germination et la croissance d'une fraction de cristaux plus parfaits et stables thermiquement, ce qui se traduit par un deuxième pic de fusion à plus haute température.



➤ **Les particules de chitosane impactent la cristallisation anisotherme du PLA mais sont sans impact sur le PHBV**

L'ajout des particules de chitosane nanométriques à un taux de 2,4% augmente significativement le taux de cristallinité du PLA alors que les particules de chitosane nébulisées et commerciales ne présentent pas d'effet significatif sur ce paramètre. L'augmentation du taux de charge à 10% augmente dans tous les cas le taux de cristallinité du PLA, qui devient équivalent pour tous les composites. Dans le cas du PLA:Com et PLA:Nebu, c'est la dégradation importante des chaînes macromoléculaires de PLA qui est principalement responsable de cette augmentation de cristallinité ; pour le PLA:Nano-10% qui n'a pas subi de dégradation des chaînes, c'est l'effet nucléant des charges qui explique ce phénomène.

Dans le cas du PHBV, les particules de chitosane ne semblent pas avoir un effet nucléant lors de la cristallisation de ce biopolyester ; ceci est possiblement dû à la présence préalable d'un agent nucléant dans le grade commercial de PHBV utilisé qui rend l'effet des charges négligeable.

Les analyses par DSC modulée et par *StepScan* ont montré la présence des phénomènes de fusion-cristallisation-fusion pour les deux polyesters, sans doute liés à la formation de cristaux moins stables thermiquement lors de la cristallisation froide qui fondent puis recristallisent sous forme de cristaux plus stables, lesquels fondent à plus haute température

➤ **Les particules de chitosane impactent la cristallisation isotherme du PLA mais sont sans impact sur le PHBV**

Dans le cas du PLA, la cristallisation a lieu en une seule étape. Quel que soit le type ou le taux de particules de chitosane, ces dernières n'impactent pas le mode de croissance des cristaux du PLA qui tend probablement vers une germination instantanée sous forme de disque. Toutefois, l'influence des charges de chitosane est avérée sur la vitesse de cristallisation qui augmente significativement par l'ajout des charges de chitosane et est généralement plus importante quand le taux de charge augmente.

Contrairement au PLA, le PHBV a montré plusieurs étapes de cristallisation, dont la durée diffère selon les températures et les échantillons ; l'effet de la température sur la cinétique de cristallisation s'est avéré toutefois prépondérant. Les faibles différences observées en fonction

de la nature et de la concentration des charges sont possiblement liées à la mobilité des chaînes qui varie en fonction de la température, des surfaces disponibles entre particules et de la longueur des chaînes macromoléculaires après extrusion. L'influence très marquée de la température sur la vitesse de cristallisation du PHBV est vraisemblablement liée au temps de latence entre les deux étapes de cristallisation qui n'a pas été pris en considération. Pour une meilleure évaluation de la vitesse de cristallisation, il serait éventuellement judicieux de traiter séparément les étapes de cristallisation.

Les difficultés rencontrées lors de la détermination du mode  $n$  et de la constante de vitesse de cristallisation  $k$  dans la première étape de cristallisation du PHBV et de ses composites, n'ont pas mis en évidence une modification du mode de cristallisation en fonction de la nature des particules de chitosane utilisées. Néanmoins, les résultats obtenus suggèrent une modification du mode de cristallisation vers une germination sporadique pour les particules nanométriques et nébulisées, en lien avec l'amélioration de la dispersion et la diminution de mobilité moléculaire associée à ces charges. Des analyses complémentaires de la distribution de masses moléculaires seraient cependant nécessaires.

Pour la deuxième étape de cristallisation, le mode de cristallisation  $n$  du PHBV et de ses composites passe d'une valeur de 2 à 3 au-delà de 118°C et la cinétique de cristallisation est significativement ralentie ; cet effet peut être lié soit à l'encombrement engendré par les cristaux de l'étape 1 qui réduit la mobilité moléculaire disponible et favorise une germination sporadique pendant l'étape 2, soit à un perfectionnement des cristaux formés pendant l'étape 1 de cristallisation.

➤ **Les particules de chitosane nanométriques ont un effet positif sur la stabilité thermique et les propriétés thermomécaniques du PLA par rapport aux particules de chitosane commerciales et nébulisées**

L'augmentation du taux de charge réduit la stabilité thermique du PLA. Les raisons qui expliquent les différents profils de dégradation obtenus sont nombreuses. Les nanoparticules de chitosane semblent toutefois être les moins néfastes à la stabilité thermique du PLA.

Les propriétés thermomécaniques du PLA sont négativement influencées par la présence des particules de chitosane commerciales et nébulisées, et particulièrement à un taux de 10%. Cette baisse est liée à la mauvaise cohésion interfaciale entre les charges de chitosane et la matrice de PLA, à des phénomènes d'agglomération des particules à 10% de charge et à la

dégradation des chaînes de PLA lié à l'incorporation des particules nébulisées et commerciales. D'un point de vue général, l'incorporation des nanoparticules de chitosane à 2,4% semblent fournir les meilleurs comportements et rigidité et ce, sur une large plage de température.

➤ **Le pouvoir antibactérien des nanoparticules de chitosane a été mis en évidence**

Seules, les nanoparticules de chitosane ont montré un effet répulsif sur la croissance d'*E.coli* sur un milieu nutritif de gélose. Cependant les films biocomposites à base de ces nanoparticules n'ont pas présenté un effet similaire, possiblement à cause d'un manque d'accessibilité aux particules de chitosane emprisonnées dans la matrice polyester. Une piste possible pour améliorer le contact entre les nanocharges de chitosane dans le film composite et les bactéries serait de favoriser la présence du chitosane en surface des films en contrôlant la formulation et le procédé de mise en forme ou en augmentant la porosité des films.

## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Ces travaux de thèse étaient consacrés à l'élaboration et à la caractérisation de nanomatériaux biocomposites à base de poly (acide lactique) PLA/chitosane et de polyhydroxy(butyrate-co-valérate) PHBV/chitosane.

Le premier objectif de l'étude était de générer des nanoparticules de polymères biosourcés à propriétés fonctionnelles en utilisant un procédé assisté par CO<sub>2</sub> supercritique. Le deuxième objectif était d'élaborer des biocomposites par extrusion-*cast* en utilisant une matrice biopolyester (PLA ou PHBV) et les bionanoparticules générées, et d'étudier leurs morphologies et leurs propriétés afin d'apporter une meilleure connaissance de ces biocomposites.

La mise en place du procédé de génération assisté par CO<sub>2</sub>-sc et les caractérisations des nanoparticules générées ont été réalisées dans un premier temps. L'élaboration des films biocomposites par extrusion-*cast* ainsi que l'étude de leurs propriétés morphologique, thermique, thermomécanique et antibactérienne a été effectuée dans une seconde étape.

Dans la première partie de ce travail, une étude bibliographique a été réalisée. Les principales caractéristiques et propriétés du chitosane, du PLA et du PHBV ainsi qu'un état de l'art sur les méthodes de génération des particules de chitosane, les techniques d'élaboration de composites à base de PLA/chitosane et de PHBV/chitosane et leurs propriétés, y ont été présentés. Parmi les polymères issus de la biomasse, le chitosane, un amino-polysaccharide, se distingue par ses nombreuses propriétés : c'est un matériau abondant, bio et cytocompatible, biodégradable, dont la structure chimique contient deux groupements fonctionnels et qui est reconnu pour son activité antibactérienne. Il est étudié pour de nombreuses applications dans le domaine biomédical et l'emballage mais on ne trouve dans la littérature que peu d'études sur sa transformation à l'échelle nanométrique et encore moins sur l'incorporation de nanocharges de chitosane dans une matrice de polymère pour réaliser un biocomposite.

La génération de particules de chitosane se fait conventionnellement par des procédés nécessitant l'utilisation de solvants organiques tels que l'acide acétique ou des hautes températures. La technologie du CO<sub>2</sub> supercritique, plus innovante, a permis la génération de nanoparticules de chitosane uniquement par les procédés SAA (*Supercritical Assisted Atomization*) et SAA-HCM (*Supercritical Assisted Atomization from Hydrodynamic Cavitation Mixer*) à partir d'une solution acide aqueuse et en utilisant le CO<sub>2</sub>-sc comme agent

d'expansion. A notre connaissance, aucune autre tentative de génération de particules de chitosane par un autre procédé assisté par le CO<sub>2</sub>-sc n'a été publiée.

Le PLA et le PHBV sont deux biopolyesters qui présentent l'avantage d'être à la fois biosourcés et biodégradables et/ou compostables. La production industrielle du PLA a été optimisée et est maîtrisée depuis quelques années ; celle du PHBV reste encore insuffisamment maîtrisée, de ce fait le PHBV reste vu comme un matériau d'avenir. Ces deux biopolyesters sont biocompatibles et dotés de propriétés mécaniques relativement bonnes mais ils sont désavantagés par leur stabilité thermique et dans certaines applications par leur perméabilité et leur manque de fonctions bioactives. Leurs applications potentielles se trouvent principalement dans les secteurs biomédical et de l'emballage. La synthèse bibliographique a montré que dans les rares études sur les composites à base de PLA/chitosane ou PHBV/chitosane, ceux-ci sont souvent produits à partir de mélanges en voie solvant (*solution-cast*, adsorption...). Uniquement deux études portent sur l'incorporation de microparticules solides de chitosane dans le PLA par voie fondue en extrusion et aucune étude n'a été réalisée sur le PHBV, ce qui a suscité notre intérêt pour l'élaboration de ces bionanocomposites.

Cette étude bibliographique nous a ainsi permis de centrer les objectifs de cette thèse et le programme des travaux.

Les travaux expérimentaux se sont focalisés dans un premier temps sur l'étude et l'optimisation des conditions de génération des nanoparticules de chitosane par deux procédés assistés par le CO<sub>2</sub>-sc – le procédé antisolvant (SAS) et le procédé de solubilisation et d'atomisation assistée par le CO<sub>2</sub>-sc (SCASA) mis en place pendant cette étude – ainsi que sur la caractérisation des particules générées en comparaison avec les particules de chitosane commercial et des particules générées par un procédé de nébulisation classique (Chapitre III).

Le procédé SAS avec l'acide acétique comme solvant a permis la génération de particules de chitosane. Des nanoparticules sphériques et denses de chitosane ont été obtenues via ce procédé mais l'aspect et la morphologie des particules diffèrent selon les conditions de récupération. Néanmoins, ce procédé s'est avéré peu reproductible à cause de la sensibilité du chitosane à la physico-chimie du milieu, notamment le pH qui évolue progressivement au cours de la dissolution et du dégazage du CO<sub>2</sub>, ainsi que la phase de lavage à l'eau et le

séchage. La fourchette opératoire du pH qui évite à la fois la dissolution et l'agglomération du chitosane est très réduite et difficilement contrôlable sous pression.

Pour contrôler ce procédé, il est donc nécessaire d'améliorer la stabilité des particules en maîtrisant l'effet anti-solvant du CO<sub>2</sub>-sc, l'effet du milieu basique ainsi que le post-traitement pour obtenir des particules sèches et propres.

Pour surmonter les obstacles du procédé SAS, un procédé original de production de nanoparticules de chitosane, SCASA, a été mise en place et a montré sa capacité à générer de façon reproductible des particules de chitosane sèches par atomisation sans avoir recours à aucun acide organique, en utilisant simplement le pouvoir acidifiant du CO<sub>2</sub> dissous dans l'eau pour solubiliser le chitosane. Cette approche très originale a permis une première publication dans le *Journal of Supercritical Fluids*.

La caractérisation des particules obtenues par ces deux procédés assistés par CO<sub>2</sub>-sc a montré une amorphisation du chitosane, sans cependant modifier significativement son degré d'acétylation. La présence résiduelle de sels dans le chitosane généré par le procédé SAS modifie la dégradation thermique du polymère alors que les particules générées par le procédé SCASA présentent une meilleure stabilité thermique.

Les résultats présentés dans cette étude ne représentent cependant que la phase préliminaire de l'étude du procédé SCASA. L'influence des paramètres opératoires (temps de dissolution, paramètres de pulvérisation, dispositif de collecte ...), des propriétés du chitosane (origine, masse moléculaire, degré d'acétylation ...) et la concentration des solutions sur le rendement, la surface spécifique et la structure macromoléculaire et cristalline des particules et la distribution de taille et de forme restent encore à étudier plus finement.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'élaboration par extrusion-*cast* de films bionanocomposites à base de PLA et de PHBV et à leur caractérisation en termes de dispersion des particules, de cristallisation et de propriétés thermiques, thermomécaniques et antibactériennes (Chapitre IV). Ce sont les nanoparticules générées par le procédé SCASA qui ont été utilisées pour l'élaboration des composites et comparées aux particules commerciales et nébulisées.

Les observations en microscopie optique et électronique à transmission ont montré que dans les conditions d'extrusion utilisées, toutes les particules de chitosane (commerciales, nébulisées et générées par le procédé SCASA) ont été dispersées avec succès dans le PLA et

le PHBV. Toutefois, l'effet du procédé d'extrusion-*cast* est plus remarquable sur l'état de dispersion des nanoparticules (SCASA) en désagrégeant correctement les agglomérats de nanoparticules observés avant extrusion. La faible taille des particules nanométriques et leur surface spécifique importante ont permis une meilleure dispersion au sein de la matrice. La mesure des tailles de particules a confirmé ces tendances mais le protocole utilisé n'a pas permis la mesure des tailles ultimes des particules de plus petites tailles ; des mesures sont en cours par un autre dispositif pour atteindre cet objectif.

Nous avons également évalué l'effet des particules de chitosane sur la cristallisation des matrices biopolyesters PLA et PHBV. Les résultats ont montré un effet du chitosane sur la cinétique et le taux de cristallisation anisotherme du PLA selon la nature et le taux de charges incorporées. L'ajout du chitosane nanométrique à hauteur de 2,4% a augmenté significativement le taux de cristallinité du PLA alors que les particules de chitosane nébulisées et commerciales n'ont pas eu d'effet significatif. L'augmentation du taux de charge à 10% a augmenté davantage le taux de cristallinité du PLA, qui est devenu équivalent pour les trois types de composites : dans le cas des particules commerciales et nébulisées, c'est la dégradation importante des chaînes moléculaires du PLA qui était principalement responsable de cette augmentation de cristallinité ; en présence des charges nanométriques, l'absence de dégradation du PLA suggère un effet nucléant de ces nanoparticules. Toutefois, quel que soit le type ou le taux de particules de chitosane, le mode de croissance des cristaux de PLA tend probablement vers une germination instantanée sous forme de disque. On notera par ailleurs que ce sont les nanoparticules qui semblent être les moins néfastes à la stabilité thermique du PLA. Dans le cas du PHBV, les particules de chitosane n'ont pas montré d'effet nucléant lors de la cristallisation de ce biopolyester ; ceci est possiblement dû à la présence préalable d'un agent nucléant dans le grade commercial de PHBV utilisé qui a rendu l'effet des charges négligeable. Lors de la première phase de cristallisation, les résultats obtenus suggèrent néanmoins une modification du mode de cristallisation vers une germination sporadique avec les particules nanométriques et nébulisées, en lien avec l'amélioration de la dispersion et l'augmentation de la surface spécifique associées à ces charges. Pour la deuxième phase de cristallisation, une modification du mode de cristallisation a été observée ainsi qu'un ralentissement de la cinétique de cristallisation; probablement lié soit à l'encombrement engendré par les cristaux de la première cristallisation soit à un perfectionnement des cristaux formés pendant la première cristallisation.



L'analyse thermomécanique des films composites à base de PLA a révélé une influence négative des particules de chitosane, sauf dans le cas des nanoparticules de chitosane à 2,4%, qui semblent fournir les meilleurs comportements et rigidité sur une large plage de température.

Enfin, les propriétés antibactériennes du chitosane ont été évaluées sur la croissance de bactéries de l'espèce *E. coli*. Seules, les nanoparticules de chitosane ont montré un effet bactériostatique sur *E. coli*. Cependant les films biocomposites à base de ces nanoparticules n'ont pas présenté un comportement similaire, probablement à cause d'un manque d'accessibilité aux particules de chitosane emprisonnées dans la matrice biopolyester. Une piste possible pour améliorer le contact entre les nanocharges de chitosane dans le composite et les bactéries serait de favoriser la présence du chitosane en surface des films ou d'augmenter la porosité des films.

Ces travaux de thèse ont démontré la faisabilité et l'intérêt d'utiliser des nanoparticules de chitosane générées par un procédé assisté par un fluide supercritique et leur incorporation dans une matrice biopolyester. Nos résultats ont montré des effets positifs et prometteurs de ces nanoparticules de chitosane sur les films composites obtenus. Pour compléter ce travail, il serait intéressant d'évaluer la qualité de l'interface entre les nanoparticules de chitosane et la matrice pour améliorer les performances mécaniques, d'étudier l'aptitude de ces nanoparticules à être modifiées pour répondre à des applications dans le domaine biomédical ou encore d'évaluer la perméabilité et la biodégradation pour des applications dans l'emballage. En ce qui concerne les procédés de génération de nanoparticules assistés par CO<sub>2</sub>-sc mis en place pendant ces travaux, ils devront être optimisés notamment par une approche classique en génie des procédés d'étude paramétrique. Par ailleurs, il serait envisageable de tester leur faisabilité pour générer des nanoparticules d'autres types de polysaccharides, la cellulose à titre d'exemple.

# **PRODUCTION SCIENTIFIQUE**

Ce travail de thèse a donné lieu à un article dans une revue internationale et à différentes communications (cinq orales et deux posters).

### **PUBLICATION DANS UNE REVUE INTERNATIONALE**

Hijazi N., Rodier E., Letourneau JJ., Louati H., Sauceau M., Le Moigne N., Benezet JC., Fages J., Chitosan nanoparticles generation using CO<sub>2</sub> assisted processes, *J. of Supercritical Fluids*, Vol(95), 2014, p. 118–128

### **PRESENTATIONS ORALES LORS DE CONFERENCES NATIONALES ET INTERNATIONALES**

- ✚ Hijazi N., Fages J., Rodier E., Sauceau M., Benezet JC., Le Moigne N., Développement de bio nanocomposites moussés par extrusion assistée par CO<sub>2</sub> supercritique. *Premières journées supercritiques JSC2012*. Albi, France 15-16 mars 2012.
- ✚ Hijazi N., Rodier E., Sauceau M., Letourneau JJ., Le Moigne N., Guibal E., Vincent T., Benezet JC., Fages J., Génération de nanoparticules de chitosane par effet antisolvant, via un procédé assisté par CO<sub>2</sub> supercritique, *7<sup>ème</sup> édition du colloque Cristallisation et Précipitation Industrielles*, 16-17 mai 2013, Toulouse et Albi, France
- ✚ Hijazi N., Rodier E., Letourneau JJ., Sauceau M., Le Moigne N., Guibal E., Vincent T., Benezet JC., Fages J., Development of nanostructured biomaterials: Chitosan nanoparticles generation by CO<sub>2</sub> assisted processes, *EPNOE 2013 International Polysaccharide Conference*, 21-24 oct 2013, Nice, France
- ✚ Fages J., Hijazi N., Letourneau JJ., Sauceau M., Rodier E., Le Moigne N., Benezet JC, Nagy ZK., Vigh T., Marosi G., New supercritical processes for the nano-structuration of polymer matrices. *Supercritical Fluids and Energy SFE'2013*, 8-11 déc 2013, Campinas, Brésil
- ✚ Hijazi N., Rodier E., Letourneau JJ., Sauceau M., Le Moigne N., Benezet JC., Fages J., Development of nanostructured films based on PLA and chitosan nanoparticles generated by supercritical CO<sub>2</sub> assisted processes, *14<sup>th</sup> European Meeting on Supercritical Fluids*, 18-21 Mai 2014, Marseille, France

**POSTER**

- ✚ Hijazi N., Rodier E., Sauceau M., Fages J., Benezet JC., Le Moigne N., Marosi G., Nagy ZK., Divided solids design in supercritical fluids: new formulations as polymer foams or nanocomposites. *Premières journées supercritiques JSC2012*, 15-16 mars 2012, Albi, France
- ✚ Hijazi N., Le Moigne N., Rodier E., Letourneau JJ., Sauceau M., Fages J., Guibal E., Vincent T., Benezet JC., Fages J., development of nanostructured films based on PLA and chitosan nanoparticles generated by supercritical CO<sub>2</sub> assisted processes, *16th European Conference on Composite Materials*, 22-26 juin 2014, Séville, Espagne.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- [1] en.european-bioplastics.org (consulté le 23 janvier 2015), European Bioplastics Institute for Bioplastics and Biocomposites.
- [2] Reddy MM, Vivekanandhan S, Misra M, Bhatia SK, Mohanty AK. Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Prog Polym Sci* 2013; 38:1653–89.
- [3] Armentano I, Dottori M, Fortunati E, Mattioli S, Kenny JM. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polym Degrad Stab* 2010; 95:2126–46.
- [4] De Moura MR, Aouada FA, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH, Krochta JM, Mattoso LHC. Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *J Food Eng* 2009; 92:448–53.
- [5] Bowman K, Leong KW. Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. *Int J Nanomedicine* 2006; 1:117–28.
- [6] Bordes P, Pollet E, Averous L. Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems. *Prog Polym Sci* 2009; 34:125–55.
- [7] Carli LN, Crespo JS, Mauler RS. PHBV nanocomposites based on organomodified montmorillonite and halloysite: The effect of clay type on the morphology and thermal and mechanical properties. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2011; 42:1601–8.
- [8] Ahir SV, Huang YY, Terentjev EM. Polymers with aligned carbon nanotubes: Active composite materials. *Polymer (Guildf)* 2008; 49:3841–54.
- [9] Sinha Ray S, Yamada K, Okamoto M, Fujimoto Y, Ogami A, Ueda K. New polylactide/layered silicate nanocomposites. 5. Designing of materials with desired properties. *Polymer* 2003; 44:6633–46.
- [10] Jarroux N. Les biopolymères: différentes familles, propriétés et applications. *Techniques de l'ingénieur*, 2008. AM 3 580
- [11] Rocha LB, Goissis G, Rossi MA. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials* 2002; 23:449–56.
- [12] Charulatha V, Rajaram A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomaterials* 2003; 24:759–67.
- [13] Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm* 2001; 221:1–22.
- [14] Gómez-Guillén MC, Pérez-Mateos M, Gómez-Estaca J, López-Caballero E, Giménez B, Montero P. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends Food Sci Technol* 2009; 20:3–16.

- [15] Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero ME, Montero MP. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocoll* 2011; 25:1813–27.
- [16] Wyart D. Les polymères biodégradables. *Techniques de l'ingénieur*, 2007. AM 3 579
- [17] Monnet D. Etude de l'évolution des propriétés mécaniques de matériaux amylicés par sélection et/ou modifications structurales dirigées. Thèse de doctorat de l'université de Reims Champagne-Ardenne, 2008.
- [18] Shanks R, Kong I. Thermoplastic Starch, In: *Thermoplastic Elastomers*. A El-Sonbati (Ed.), InTech; 2012. ISBN: 978-953-51-0346-2. Disponible sur: <http://www.intechopen.com/books/thermoplastic-elastomers/thermoplastic-starch>
- [19] Chang PR, Jian R, Yu J, Ma X. Fabrication and characterisation of chitosan nanoparticles /plasticised-starch composites. *Food Chem* 2010; 120:736–40.
- [20] Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* 2012; 37:106–26.
- [21] Queen D, Evans JH, Gaylor JDS, Courtney JM, Reid WH. Burn wound dressings—a review. *Burns* 1987; 13:218–28.
- [22] Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003; 24:4337–51
- [23] Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* 2012; 37:106–26.
- [24] Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci* 2006; 31:603–32.
- [25] Ravi Kumar MN V. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 2000; 46:1–27.
- [26] Kurita K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Mar Biotechnol* 2006; 8:203–26.
- [27] Kurita K, Yoshida Y, Umemura T. Finely selective protections and deprotections of multifunctional chitin and chitosan to synthesize key intermediates for regioselective chemical modifications. *Carbohydr Polym* 2010; 81:434–40.
- [28] Badot P-M, Crini G, Guibal É. *Chitine et chitosane: Du biopolymère à l'application*. Presses Univ. Franche-Comté; 2009. ISBN 978-2-84867-249-6.
- [29] Mochizuki M, Kadoya Y, Wakabayashi Y, Kato K, Okazaki I, Yamada M, Sato T, Sakairi N, Nishi N, Nomizu M. Laminin-1 peptide-conjugated chitosan membranes as a novel approach for cell engineering. *FASEB J* 2003; 17:875–7.
- [30] Jaworska M, Sakurai K, Gaudon P, Guibal E. Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties. *Polym Int* 2003; 52:198–205.



- [31] Brugnerotto J, Lizardi J, Goycoolea FM, Argüelles-Monal W, Desbrières J, Rinaudo M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 2001; 42:3569–80.
- [32] Beil S, Schamberger A, Naumann W, Machill S, van Pée K-H. Determination of the degree of N-acetylation (DA) of chitin and chitosan in the presence of water by first derivative ATR FTIR spectroscopy. *Carbohydr Polym* 2012; 87:117–22.
- [33] Kubota N, Tatsumoto N, Sano T, Toya K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydr Res* 2000; 324:268–74.
- [34] Shen Y-B, Du Z, Wang Q, Guan Y-X, Yao S-J. Preparation of chitosan microparticles with diverse molecular weights using supercritical fluid assisted atomization introduced by hydrodynamic cavitation mixer. *Powder Technol* 2014; 254:416–24.
- [35] Xu Y, Du Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int J Pharm* 2003; 250:215–26.
- [36] Kasai MR. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydr Polym* 2007; 68:477–88.
- [37] Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci* 2011; 36:981–1014.
- [38] Park S, Marsh K, Rhim J. Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. *J Food Sci* 2002; 67:194–97.
- [39] Ogawa K. Effect of Heating an Aqueous Suspension of Chitosan on the Crystallinity and Polymorphs. *Agric Biol Chem* 1991; 55:2375–9.
- [40] Ogawa K, Yui T. Crystallinity of Partially N-Acetylated Chitosans. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993; 57:1466–9.
- [41] Urbanczyk GW, Lipp-Symonowicz B. The influence of processing terms of chitosan membranes made of differently deacetylated chitin on the crystalline structure of membranes. *J Appl Polym Sci* 1994; 51:2191–4.
- [42] Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56:1467–80.
- [43] Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* 2001; 22:261–8.
- [44] Benhabiles MS, Salah R, Lounici H, Drouiche N, Goosen MFA, Mameri N. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocoll* 2012; 29:48–56.

- [45] Saita K, Nagaoka S, Shirosaki T, Horikawa M, Matsuda S, Ihara H. Preparation and characterization of dispersible chitosan particles with borate crosslinking and their antimicrobial and antifungal activity. *Carbohydr Res* 2012; 349:52–8.
- [46] Takahashi T, Imai M, Suzuki I, Sawai J. Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. *Biochem Eng J* 2008; 40:485–91.
- [47] Na JH, Lee S-Y, Lee S, Koo H, Min KH, Jeong SY, et al. Effect of the stability and deformability of self-assembled glycol chitosan nanoparticles on tumor-targeting efficiency. *J Control Release* 2012;163:2–9. doi:10.1016/j.jconrel.2012.07.028.
- [48] Yhee JY, Koo H, Lee DE, Choi K, Kwon IC, Kim K. Multifunctional Chitosan Nanoparticles for Tumor Imaging and Therapy. In: Jayakumar R, Prabakaran M, Muzzarelli RAA, editors. *Chitosan Biomater. I*, Springer Berlin Heidelberg; 2011, p. 139–61.
- [49] Xin-Yuan S, Tian-Wei T. New Contact Lens Based on Chitosan/Gelatin Composites. *J Bioact Compat Polym* 2004; 19:467–79.
- [50] Woodgate DE, Conquer JA. Effects of a stimulant-free dietary supplement on body weight and fat loss in obese adults: a six-week exploratory study. *Curr Ther Res Clin Exp* 2003; 64:248–62.
- [51] Kanauchi O, Deuchi K, Imasato Y, Shizukuishi M, Kobayashi E. Mechanism for the Inhibition of Fat Digestion by Chitosan and for the Synergistic Effect of Ascorbate. *Biosci Biotechnol Biochem* 1995; 59:786–90.
- [52] Metso S, Ylitalo R, Nikkilä M, Wuolijoki E, Ylitalo P, Lehtimäki T. The effect of long-term microcrystalline chitosan therapy on plasma lipids and glucose concentrations in subjects with increased plasma total cholesterol: a randomised placebo-controlled double-blind crossover trial in healthy men and women. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59:741–6.
- [53] Rorrer GL, Hsien TY, Way JD. Synthesis of porous-magnetic chitosan beads for removal of cadmium ions from wastewater. *Ind Eng Chem Res* 1993; 32:2170–8.
- [54] Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 2003; 24:2339–49.
- [55] Guibal E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Sep Purif Technol* 2004; 38:43–74.
- [56] Ji C, Annabi N, Khademhosseini A, Dehghani F. Fabrication of porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering using dense gas CO<sub>2</sub>. *Acta Biomater* 2011; 7:1653–64.
- [57] Cardea S, Pisanti P, Reverchon E. Generation of chitosan nanoporous structures for tissue engineering applications using a supercritical fluid assisted process. *J Supercrit Fluids* 2010; 54:290–5.

- [58] Marroquin JB, Rhee KY, Park SJ. Chitosan nanocomposite films: enhanced electrical conductivity, thermal stability, and mechanical properties. *Carbohydr Polym* 2013; 92:1783–91.
- [59] Kurek M, Galus S, Debeaufort F. Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. *Food Packag Shelf Life* 2014; 1:56–67.
- [60] Xu Y, Ren X, Hanna MA. Chitosan/clay nanocomposite film preparation and characterization. *J Appl Polym Sci* 2006; 99:1684–91.
- [61] Pradal C, Kithva P, Martin D, Trau M, Grøndahl L. Improvement of the wet tensile properties of nanostructured hydroxyapatite and chitosan biocomposite films through hydrophobic modification. *J Mater Chem* 2011; 21:2330.
- [62] Correlo VM, Boesel LF, Bhattacharya M, Mano JF, Neves NM, Reis RL. Properties of melt processed chitosan and aliphatic polyester blends. *Mater Sci Eng A* 2005; 403:57–68.
- [63] Suyatna NE, Copinet A, Tighzert L, Coma V. Mechanical and Barrier Properties of Biodegradable Films Made from Chitosan and Poly (Lactic Acid) Blends. *J Polym Environ* 2004; 12:1–6.
- [64] Bonilla J, Fortunati E, Vargas M, Chiralt A, Kenny JM. Effects of chitosan on the physicochemical and antimicrobial properties of PLA films. *J Food Eng* 2013; 119:236–43.
- [65] Ikejima T, Yagi K, Inoue Y. Thermal properties and crystallization behavior of poly(3-hydroxybutyric acid) in blends with chitin and chitosan. *Macromol Chem Phys* 1999; 200:413–21.
- [66] Martel-Estrada SA, Martínez-Pérez CA, Chacón-Nava JG, García-Casillas PE, Olivas-Armendáriz I. In vitro bioactivity of chitosan/poly (d,l-lactide-co-glycolide) composites. *Mater Lett* 2011; 65:137–41.
- [67] Elsabee MZ, Abdou ES. Chitosan based edible films and coatings: a review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013; 33:1819–41.
- [68] Xu YX, Kim KM, Hanna MA, Nag D. Chitosan–starch composite film: preparation and characterization. *Ind Crops Prod* 2005; 21:185–92.
- [69] Rafiee A, Alimohammadian MH, Gazori T, Riazi-rad F, Fatemi SMR, Parizadeh A, et al. Comparison of chitosan, alginate and chitosan/alginate nanoparticles with respect to their size, stability, toxicity and transfection. *Asian Pacific J Trop Dis* 2014; 4:372–7.
- [70] Nair V, Panigrahy A, Vinu R. Development of novel chitosan–lignin composites for adsorption of dyes and metal ions from wastewater. *Chem Eng J* 2014; 254:491–502.

- [71] Fukuda M, Peppas NA, McGinity JW. Properties of sustained release hot-melt extruded tablets containing chitosan and xanthan gum. *Int J Pharm* 2006; 310:90–100.
- [72] Charoenthai N, Kleinebudde P, Puttipipatkachorn S. Influence of chitosan type on the properties of extruded pellets with low amount of microcrystalline cellulose. *AAPS PharmSciTech* 2007; 8:E1–11.
- [73] Jridi M, Hajji S, Ayed H Ben, Lassoued I, Mbarek A, Kammoun M, et al. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin-chitosan composite edible films. *Int J Biol Macromol* 2014; 67:373–9.
- [74] Liu M, Zhou Y, Zhang Y, Yu C, Cao S. Physicochemical, mechanical and thermal properties of chitosan films with and without sorbitol. *Int J Biol Macromol* 2014; 70:340–6.
- [75] Leceta I, Arana P, Guerrero P, de la Caba K. Structure–moisture sorption relation in chitosan thin films. *Mater Lett* 2014; 128:125–7.
- [76] Jeevitha D, Amarnath K. Chitosan/PLA nanoparticles as a novel carrier for the delivery of anthraquinone: synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity evaluation. *Colloid Surf B Biointerfaces* 2013; 101:126–34.
- [77] Loomis GL, Murdoch JR. Polylactide compositions. US4902515 A, 1990.
- [78] Lunt J, Shafer AL. Polylactic Acid Polymers from Corn. Applications in the Textiles Industry. *J Ind Text* 2000; 29:191–205.
- [79] Garlotta D. A literature review of poly (lactic acid). *J Polym Environ* 2001; 9:63-84.
- [80] Auras R a., Harte B, Selke S, Hernandez R. Mechanical, Physical, and Barrier Properties of Poly(Lactide) Films. *J Plast Film Sheeting* 2003; 19:123–35.
- [81] Kolstad JJ. Crystallization kinetics of poly(L-lactide-co-meso-lactide). *J Appl Polym Sci* 1996; 62:1079–91.
- [82] Huang J, Lisowski MS, Runt J, Hall ES, Kean RT, Buehler N. Crystallization and Microstructure of Poly(L-lactide-co-meso-lactide) copolymers. *Macromolecules* 1998; 31:2593–9.
- [83] Dorgan JR, Lehermeier H, Mang M. Thermal and Rheological Properties of Commercial-Grade Poly(Lactic Acid)s. *J Polym Environ* 2000; 8:1–9.
- [84] Schmack G, Tändler B, Vogel R, Beyreuther R, Jacobsen S, Fritz H-G. Biodegradable fibers of poly(L-lactide) produced by high-speed melt spinning and spin drawing. *J Appl Polym Sci* 1999; 73:2785-97.
- [85] Perego G, Cella GD, Bastioli C. Effect of molecular weight and crystallinity on poly(lactic acid) mechanical properties. *J Appl Polym Sci* 1996; 59:37–43.

- [86] Armentano I, Bitinis N, Fortunati E, Mattioli S, Rescignano N, Verdejo R, et al. Multifunctional nanostructured PLA materials for packaging and tissue engineering. *Prog Polym Sci* 2013; 38:1720–47.
- [87] Raquez J-M, Habibi Y, Murariu M, Dubois P. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. *Prog Polym Sci* 2013; 38:1504–42.
- [88] Rhim J-W, Hong S-I, Ha C-S. Tensile, water vapor barrier and antimicrobial properties of PLA/nanoclay composite films. *LWT - Food Sci Technol* 2009; 42:612–7.
- [89] Sinha Ray S, Yamada K, Okamoto M, Ueda K. New polylactide-layered silicate nanocomposites. 2. Concurrent improvements of material properties, biodegradability and melt rheology. *Polymer (Guildf)* 2003; 44:857–66.
- [90] Nam JY, Sinha Ray S, Okamoto M. Crystallization Behavior and Morphology of Biodegradable Polylactide/Layered Silicate Nanocomposite. *Macromolecules* 2003; 36:7126–31.
- [91] Balakrishnan H, Hassan A, Wahit MU, Yussuf AA, Razak SBA. Novel toughened polylactic acid nanocomposite: Mechanical, thermal and morphological properties. *Mater Des* 2010;31:3289–98.
- [92] Hong Z, Zhang P, He C, Qiu X, Liu A, Chen L, et al. Nano-composite of poly(L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials* 2005; 26:6296–304.
- [93] Jonoobi M, Harun J, Mathew AP, Oksman K. Mechanical properties of cellulose nanofiber (CNF) reinforced polylactic acid (PLA) prepared by twin screw extrusion. *Compos Sci Technol* 2010; 70:1742–7.
- [94] Petinakis E, Liu X, Yu L, Way C, Sangwan P, Dean K, et al. Biodegradation and thermal decomposition of poly(lactic acid)-based materials reinforced by hydrophilic fillers. *Polym Degrad Stab* 2010; 95:1704–7.
- [95] Avella M, Martuscelli E, Raimo M. Review Properties of blends and composites based on poly(3-hydroxy)butyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHBV) copolymers. *J Mater Sci* 2000; 35:523–45.
- [96] Matsumoto K, Nakae S, Taguchi K, Matsusaki H, Seki M, Doi Y. Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyalkanoates) Copolymer from Sugars by Recombinant *Ralstonia eutropha* Harboring the phaC1Ps and the phaGPs Genes of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules* 2001; 2:934–9.
- [97] Suriyamongkol P, Weselake R, Narine S, Moloney M, Shah S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review. *Biotechnol Adv* 2007; 25:148–75.
- [98] Chee JY, Yoga SS, Lau NS, Ling SC, Abed RM, Sudesh K. Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate ( PHA): Converting Renewable Resources into Bioplastics.

- Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. A Méndez-Vila (Ed.) 2010; 2:1395–404.
- [99] Steinbüchel A. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 128:219–28.
- [100] Choi J, Lee SY. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999; 51:13–21.
- [101] De Koning GJM, Lemstra PJ. Crystallization phenomena in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: 2. Embrittlement and rejuvenation. *Polymer* 1993; 34:4089–94.
- [102] De Koning GJM, Scheeren a. HC, Lemstra PJ, Peeters M, Reynaers H. Crystallization phenomena in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: 3. Toughening via texture changes. *Polymer* 1994; 35:4598–605.
- [103] Doi Y, Kitamura S, Abe H. Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules* 1995; 28:4822–8.
- [104] Abe H, Doi Y. Side-Chain Effect of Second Monomer Units on Crystalline Morphology, Thermal Properties, and Enzymatic Degradability for Random Copolyesters of ( R )-3-Hydroxybutyric Acid with (R)-3-Hydroxyalkanoic Acids. *Biomacromolecules* 2002; 3:133–8.
- [105] Gunaratne LMWK, Shanks RA. Melting and thermal history of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) using step-scan DSC. *Thermochim Acta* 2005; 430:183–90.
- [106] Bauer H, Owen A. Some structural and mechanical properties of bacterially produced poly- $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate. *Colloid Polym Sci* 1988; 247:241–7.
- [107] Kusaka S, Iwata T, Doi Y. Properties and biodegradability of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] produced by a recombinant *Escherichia coli*. *Int J Biol Macromol* 1999; 25:87–94.
- [108] Iwata T, Tsunoda K, Aoyagi Y, Kusaka S, Yonezawa N, Doi Y. Mechanical properties of uniaxially cold-drawn films of poly([R]-3-hydroxybutyrate). *Polym Degrad Stab* 2003; 79:217–24.
- [109] Matsusaki H, Abe H, Doi Y. Biosynthesis and Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co -3-hydroxyalkanoates) by Recombinant Strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules* 2000; 1:17-22.
- [110] Avérous L, Pollet E. Environmental Silicate Nano-Biocomposites- Green energy and technology, series, London, Springer Science & Business Media; 2012, ISBN 978-1-4471-4108-2, 450p.
- [111] Mohamed El-Hadi A. Investigation of the effect of nano-clay type on the non-isothermal crystallization kinetics and morphology of poly(3(R)-hydroxybutyrate) PHB/clay nanocomposites. *Polym Bull* 2014; 71:1449–70.

- [112] Hazer DB, Kılıçay E, Hazer B. Poly(3-hydroxyalkanoate)s: Diversification and biomedical applications. *Mater Sci Eng C* 2012; 32:637–47.
- [113] Sinharay S, Bousmina M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. *Prog Mater Sci* 2005; 50:962–1079.
- [114] Fages J, Lochard H, Letourneau J-J, Sauceau M, Rodier E. Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. *Powder Technol* 2004; 141:219–26.
- [115] Akbuğa J, Durmaz G. Preparation and evaluation of cross-linked chitosan microspheres containing furosemide. *Int J Pharm* 1994; 111:217–22.
- [116] Shu XZ, Zhu KJ. A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery. *Int J Pharm* 2000; 201:51–8.
- [117] Mao H-Q, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release* 2001; 70:399–421.
- [118] He P, Davis SS, Illum L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *Int J Pharm* 1999; 187:53–65.
- [119] Tokumitsu H, Ichikawa H, Fukumori Y. Chitosan-Gadopentetic Acid Complex Nanoparticles for Gadolinium Neutron-Capture Therapy of Cancer: Preparation by Novel Emulsion-Droplet Coalescence Technique and Characterization. *Pharm Res* 1999; 16:1830–5.
- [120] Mitra S, Gaur U, Ghosh P., Maitra A. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran–doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J Control Release* 2001; 74:317–23.
- [121] Agnihotri SA, Aminabhavi TM. Controlled release of clozapine through chitosan microparticles prepared by a novel method. *J Control Release* 2004; 96:245–59.
- [122] Fages J, Letourneau JJ, Sauceau M, Rodier E. Élaboration de solides divisés par fluides supercritiques. *Technique de l'ingénieur* 2005. RE26. pp 1-12
- [123] Calvignac B. Mise au point de méthodes de caractérisation de binaires en milieu supercritique et modélisation des propriétés physiques et thermodynamiques mesurées. Thèse de doctorat de l'Ecole des Mines ParisTech, 2009.
- [124] Nunes da Ponte M. The thermodynamics of supercritical fluids. In: *Supercritical Fluids and Materials*. Bonnaudin N, Cansell F, Fouassier O. (Eds.); ISBN 2-905267-39-9, 2003.pp 209-25
- [125] Fages J. Powder processing using supercritical fluids. In: *Supercritical Fluids and Materials*. Bonnaudin N, Cansell F, Fouassier O. (Eds.); ISBN 2-905267-39-9, 2003.pp 33-85

- [126] Rantakylä M. Particle production by supercritical antisolvent processing techniques. PhD dissertation of the Helsinki University of Technology. 2004.
- [127] Jung J, Perrut M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. *J Supercrit Fluids* 2001; 20:179–219.
- [128] Reverchon E, Antonacci A. Chitosan Microparticles Production by Supercritical Fluid Processing. *Ind Eng Chem Res* 2006; 45:5722–8.
- [129] Subra P, Jestin P. Powders elaboration in supercritical media: comparison with conventional routes. *Powder Technol* 1999; 103:2–9.
- [130] Adami R, Liparoti S, Reverchon E. A new supercritical assisted atomization configuration, for the micronization of thermolabile compounds. *Chem Eng J* 2011; 173:55–61.
- [131] Ikejima T, Inoue Y. Crystallization behavior and environmental biodegradability of the blend films of poly(3-hydroxybutyric acid) with chitin and chitosan. *Carbohydr Polym* 2000; 41:351–6.
- [132] Oliveira M, Machado A V. Preparation of polymer-based nanocomposites by different routes, Nova Publishers; 2013, 22 p. (disponible sur <http://hdl.handle.net/1822/26120>)
- [133] Casettari L, Castagnino E, Stolnik S, Lewis A, Howdle SM, Illum L. Surface characterisation of bioadhesive PLGA/chitosan microparticles produced by supercritical fluid technology. *Pharm Res* 2011; 28:1668–82.
- [134] Nafee N, Schneider M, Schaefer UF, Lehr C-M. Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile. *Int J Pharm* 2009; 381:130–9.
- [135] Ravi Kumar MN V, Bakowsky U, Lehr CM. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials* 2004; 25:1771–7.
- [136] Sébastien F, Stéphane G, Copinet A, Coma V. Novel biodegradable films made from chitosan and poly(lactic acid) with antifungal properties against mycotoxinogen strains. *Carbohydr Polym* 2006; 65:185–93.
- [137] Messai I, Lamalle D, Munier S, Verrier B, Ataman-Önal Y, Delair T. Poly(d,l-lactic acid) and chitosan complexes: interactions with plasmid DNA. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2005; 255:65–72.
- [138] Zhu A, Zhang M, Wu J, Shen J. Covalent immobilization of chitosan/heparin complex with a photosensitive hetero-bifunctional crosslinking reagent on PLA surface. *Biomaterials* 2002; 23:4657–65.
- [139] Yuan X-B, Yuan Y-B, Jiang W, Liu J, Tian E-J, Shun H-M, et al. Preparation of rapamycin-loaded chitosan/PLA nanoparticles for immunosuppression in corneal transplantation. *Int J Pharm* 2008; 349:241–8.



- [140] Xu J, Zhang J, Gao W, Liang H, Wang H, Li J. Preparation of chitosan/PLA blend micro/nanofibers by electrospinning. *Mater Lett* 2009; 63:658–60.
- [141] Veleirinho B, Ribeiro-do-Valle RM, Lopes-da-Silva JA. Processing conditions and characterization of novel electrospun poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)/chitosan blend fibers. *Mater Lett* 2011; 65:2216–9.
- [142] Weinhold MX, Sauvageau JCM, Keddig N, Matzke M, Tartsch B, Grunwald I, et al. Strategy to improve the characterization of chitosan for sustainable biomedical applications: SAR guided multi-dimensional analysis. *Green Chem* 2009; 11:498-509.
- [143] Cabedo L, Plackett D, Giménez E, Lagarón JM. Studying the degradation of polyhydroxybutyrate- co -valerate during processing with clay-based nanofillers. *J Appl Polym Sci* 2009; 112:3669–76.
- [144] Rao DG. Studies on Viscosity-Molecular Weight Relationship of Chitosan Solutions. *J Food Sci Technol* 1993; 30:66-67.
- [145] Kwaambwa HM, Goodwin JW, Hughes RW, Reynolds PA. Viscosity, molecular weight and concentration relationships at 298K of low molecular weight cis-polyisoprene in a good solvent. *Colloid Surf A-Physicochem Eng Asp* 2007; 294:14–9.
- [146] Fischer EW, Sterzel HJ, Wegner G. Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polym* 1973; 251:980–90.
- [147] Yasuniwa M, Tsubakihara S, Sugimoto Y, Nakafuku C. Thermal analysis of the double-melting behavior of poly(L-lactic acid). *J Polym Sci Part B Polym Phys* 2004; 42:25–32.
- [148] Khan TA, Peh KK, Ch'ng HS. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *J Pharm Pharm Sci*; 5:205–12.
- [149] Kasai M. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydr Polym* 2008; 71:497–508.
- [150] Diamond LW, Akinfiyev NN. Solubility of CO<sub>2</sub> in water from –1.5 to 100 °C and from 0.1 to 100 MPa: evaluation of literature data and thermodynamic modelling. *Fluid Phase Equilib* 2003; 208:265–90.
- [151] Rinaudo M, Pavlov G, Desbrieres J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer* 1999; 40:7029–32.
- [152] Peng C, Crawshaw JP, Maitland GC, Martin Trusler JP, Vega-Maza D. The pH of CO<sub>2</sub>-saturated water at temperatures between 308K and 423K at pressures up to 15MPa. *J Supercrit Fluids* 2013; 82:129–37.

- [153] Mulder M. *Basic Principles of Membrane Technology*, Kluwer Academic Publishers, Pays-Bas, 1996; 564p.
- [154] Hijazi N, Rodier E, Letourneau JJ, Louati H, Sauceau M, Le Moigne N, Benezet JC, Fages J. Chitosan nanoparticles generation using CO<sub>2</sub> assisted processes. *J Supercrit Fluids* 2014; 95:118–28.
- [155] Read AJ. The first ionization constant of carbonic acid from 25 to 250°C and to 2000 bar. *J Solution Chem* 1975; 4:53–70.
- [156] Okuyama K, Noguchi K, Kanenari M, Egawa T, Osawa K, Ogawa K. Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydr Polym* 2000; 41:237–47.
- [157] Nunthanid J, Laungtana-Anan M, Sriamornsak P, Limmatvapirat S, Puttipipatkachorn S, Lim LY, et al. Characterization of chitosan acetate as a binder for sustained release tablets. *J Control Release* 2004; 99:15–26.
- [158] Neto CGT, Giacometti JA, Job AE, Ferreira FC, Fonseca JLC, Pereira MR. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. *Carbohydr Polym* 2005; 62:97–103.
- [159] Judd MD, Plunkett BA, Pope MI. The thermal decomposition of calcium, sodium, silver and copper(II) acetates. *J Therm Anal* 1974; 6:555–63.
- [160] Nam YS, Park WH, Ihm D, Hudson SM. Effect of the degree of deacetylation on the thermal decomposition of chitin and chitosan nanofibers. *Carbohydr Polym* 2010; 80:291–5.
- [161] Puttipipatkachorn S, Nunthanid J, Yamamoto K, Peck GE. Drug physical state and drug-polymer interaction on drug release from chitosan matrix films. *J Control Release* 2001; 75:143–53.
- [162] Peurton F. *Nanocomposites à matrice thermoplastique et renfort plaquettaires: relations élaboration - structure - propriétés*. Thèse de doctorat de l'Université Lille 1, 2008.
- [163] Shieh Y-T, Liu G-L. Temperature-modulated differential scanning calorimetry studies on the origin of double melting peaks in isothermally melt-crystallized poly(L-lactic acid). *J Polym Sci Part B Polym Phys* 2007; 45:466–74.
- [164] Stoclet G. *Etude de la structuration à différents niveaux d'échelle et du comportement thermomécanique d'un polymère issu de ressources renouvelables: l'acide Poly(lactique)*. Thèse de doctorat de l'Université Lille 1, 2009.
- [165] Kulinski Z, Piorkowska E. Crystallization, structure and properties of plasticized poly(l-lactide). *Polymer (Guildf)* 2005; 46:10290–300.
- [166] Gérard T. *Elaboration et caractérisation de matériaux multiphasiques à base de polylactide (PLA) et de polyhydroxyalcanoates (PHA)*. Thèse de doctorat de l'Ecole des Mines ParisTech, 2013.

- [167] Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol* 2010; 144:51–63.
- [168] Zheng L-Y, Zhu J-F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr Polym* 2003; 54:527–30.
- [159] Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr Res* 2004; 339:2693–700.
- [170] Wei D, Sun W, Qian W, Ye Y, Ma X. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydr Res* 2009; 344:2375–82.



---

## Développement de composites nanostructurés à base de biopolyesters et de nanoparticules de chitosane générées par des procédés assistés par CO<sub>2</sub> supercritique

### RÉSUMÉ

Dans une logique d'éco-conception et de développement durable, de nombreux travaux ont pour objectif l'étude de polymères biosourcés. Parmi les recherches menées à ce jour, une piste d'étude consiste à les structurer aux échelles micro et nanoscopiques tout en valorisant certaines de leurs propriétés spécifiques, l'objectif étant la création de matériaux à propriétés fonctionnelles originales et performantes.

Dans ce contexte, une attention particulière a été portée sur l'utilisation du dioxyde de carbone supercritique (CO<sub>2</sub>-sc). En effet, sa capacité à se solubiliser en grande quantité dans de nombreux polymères et donc d'en modifier des propriétés (viscosité, tension interfaciale, ...) peut permettre une amélioration des matériaux composites fabriqués.

Ce projet s'intéresse plus particulièrement à l'élaboration d'assemblages de biopolymères nanostructurés et revêt deux enjeux principaux :

- (1) la synthèse de nanoparticules de biopolymères (dans notre cas, du chitosane),
- (2) l'élaboration d'assemblage de biopolymères nanostructurés.

La première étape a consisté à concevoir et développer de nouveaux procédés de génération de nanoparticules de chitosane par des procédés utilisant le CO<sub>2</sub>-sc soit comme antisolvant soit comme agent de dissolution et d'atomisation. Pour la deuxième étape, des films composites à base de poly (acide lactique) PLA et de poly (hydroxybutyrate-co-valérate) PHBV ont été préparés par la voie hot-melt par extrusion bi-vis. Des analyses thermiques, moléculaires et structurales, morphologiques et de granulométrie ont permis de caractériser les films biocomposites ainsi produits.

**Mots clés:** Biomériau, Fluide supercritique, Antisolvant, Nanoparticules, Chitosane, Biopolyesters, Extrusion film

---

## Development of nanostructured composites based on biopolyesters and chitosan nanoparticles generated by supercritical CO<sub>2</sub> assisted processes

### ABSTRACT

In a logic of eco-design and sustainable development, many works aim to study bio-sourced polymers. Among these studies, a promising concept consists in structuring materials at micro and nanoscales while enhancing some of their properties, the objective being the creation of original materials with improved functional properties and performance. In this context, particular attention has been paid to the use of supercritical carbon dioxide (sc-CO<sub>2</sub>). Its ability to dissolve into many polymers in large quantities and thus to change their properties (viscosity, interfacial tension, ...), can improve both the composite material and its manufacturing process.

This project focuses on the development of nanostructured biopolymers and addresses two main issues:

- (1) the synthesis of biopolymer nanoparticles (in this case: chitosan),
- (2) the development of nanostructured biopolymers.

The first step consisted in designing and developing new processing methods to generate biopolymer nanoparticles, using sc-CO<sub>2</sub> as antisolvent agent or as dissolving and atomizing agent. For the second step, poly (lactic acid) PLA and poly (hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric acid) PHBV based composite films were prepared by a hot-melt process by twin-screw extrusion of the nanoparticles and the matrix. Thermal, molecular and structural analyses, as well as morphological and particle size distribution studies allowed a good characterization of the biocomposite films.

**Keywords:** Biomaterial, Supercritical fluid, Antisolvent, Nanoparticles, Chitosan, Biopolyester, Film extrusion

---