REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE MEDEA
FACULTE DES SCIENCES



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de master

En Chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Par :

Gherdaoui Somia & Ladek Fathia

Thème :

Production de biomolécule à effet antimicrobien par méthode biologique

Soutenue publiquement le : 23/06/2019 Devant le jury composé de :

Dr. Rebouh S.	MCA	Université de Médéa	Présidente.
Dr.Zouambia Y.	MCA	Université de Médéa	Examinatrice.
Dr. Arbia W.	MCB	Université de Médéa	Promotrice.

Année universitaire : 2018- 2019

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

L*'amour de mon cœur et à la source de compassion, ma précieuse mère****Fatiha****, que Dieu ait pitié elle, qui a sacrifié pour moi ce que j'ai atteint aujourd'hui.*

L*a tombe de mon père****Mohammed****, que Dieu le garde. La source de respect et d'idéal dans cette vie.*

U*n jumeau spirituel et à l'amour de ma vie et à mon compagnon* ***Oussama*** *qui m'a accompagné et m'a encouragé tout au long de ce voyage.*

M*es chers frères : Nasser, Salim et Merzak.*

M*es chères sœurs : Bahia, Naima et Ritadje.*

M*on grand-père El sebti et à ma grand-mère Aisha.*

M*a tente :Fatima, Fadilah, Massouda, Dawya, Rabia et Khokha.*

M*es collègues : Wafaa, Ghania, Khadjidja, Marieme, fatiha, Samiha, Fatima, Hafida, Ibtissam, Amina et yossra.*

T*outes les familles : Gherdaoui, Missaoui et Hadjimi.*

M*a binôme Ladek fathia et sa famille.*

Ce travail est dédicacé aussi à toutes mes enseignantes et à tous mes enseignants d'hier et d'aujourd'hui, de l'école primaire à l'université. Avec ma sincère reconnaissance et un grand merci d'avoir nourri ma connaissance et exalté mon goût pour la savoir.

SOMIA.

Je incline devant Dieu Tout – Puissant qui m'a ouvert la porte du savoir et m'a aidé à la franchir.

Je dédie ce travail :

***A** ma mère **(Fatima Zohra),** source d'affectation de courage et d'inspiration qui a autant sacrifié pour me voir atteindre ce jour.*

***A** mon père **(Abd Elazize),** source de respect,*
en témoignage de ma profonde reconnaissance pour tout l'effort et le soutien incessant qui m'a toujours apporté.

***A** mon fiancé : Rafa Mohamed.*
***A** mes frères : Abd elnour, Billal.*
***A** mes sœurs : Soulef, Merieme, Fadhila, Wahiba.*
***A** tout mon petits à : Abd el kader et Rehabe.*
***A** toutes familles : Ladek et Messoudani.*

***U**ne spéciale dédicace à mes collègues : Khadidja, Habiba, Marwa, Hayet, Nassira, Fatiha, Imane, Sara, Affaf, Ichrek, Ikrame, Amina, Salah, Yassine, Fatima Zohra et Fatima.*

***A**mon binôme : Somia et sa famille.*
***A** toute la promotion chimie pharmaceutique 2018/2019.*

FATHIA.

REMERCIMENTS

Tout d'abord, nous remercions ALLAH pour la santé et la volonté de mettre fin à notre parcours universitaire, du primaire à l'université.

Ce mémoire est le résultat de trois mois d'effort et de travail, qui n'aurait jamais était achevé sans l'aide et le support de beaucoup de personnes. Nous adressons nos sincères remerciements :

Nous exprimons notre profonde gratitude à notre superviseure, M^{me} ARBIA. W, docteure à l'université de Médéa, d'avoir accepté de nous accompagner durant cette période.
Nos sincères remerciements s'adressent au Dr. REBOUH S. et Dr. ZOUAMBIA Y. d'avoir accepté de présider et d'examiner notre mémoire.

Nous voudrions également remercie M^{r} CHIBA Younes, directeur du Hall technologie, de nous avoir fourni les capacités techniques qui nous ont aidés dans ce travail.

Nous remercions également l'informateur de l'établissement public et de la santé de quartier, en particulier M^{me}BELHAWARI N. pour son aide précieuse dans la réalisation des activités antimicrobienne.

A tous les enseignants et enseignantes du département de science et toute la famille Universitaire Dr. Yahia Farés de Médéa.

Finalement, on remercie toutes les personnes ayant contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici le témoignage de nos reconnaissances, nos meilleurs remerciements et l'expression de nos profond respect.

الملخص
الهدف من هذا العمل هو استخراج الكيتين من قشور الروبيان بطريقة بيولوجية باستخدام بكتيريا حمض اللبن وتحضير الكيتوزان عن طريق نزع جزيء الاستيل من الكيتين . سمح لنا استخدام 213غ من مسحوق الروبيان بالحصول على 95 غ من الكيتين بعائد 44,6 ٪ و22.5 غ بعائد 25 ٪. من الكيتوزان قابل للذوبان في محلول حمض الخل 1 ٪ مع درجة لزوجة مقدرة ب 10,64 دل/غ والوزن الجزيئي بحوالي 27 ميغادالتون.
للتحقق من نشاط الكيتوزان المضاد للميكروبات، قمنا باستخلاص عصيرالثوم والبصل ودراسة نشاط كل منهم على حدا بالاضافة إلى دراسة مفعول مزيج كل منهما مع الكيتوزان ضد عدة سلالات مسببة للأمراض معزولة عن بول المرضى.
أظهرت النتائج التدابير التالية ان الثوم مضاد بكتيري قوي متبوع بالكيتوزان حيث أن قطرمنطقة تثبيط الكيتوزان هي (مم12-20)؛ منطقة تثبيط عصير الثوم هي (مم15-40) ؛ منطقة تثبيط عصيرالبصل هي (مم10-18) ؛ منطقة تثبيط الكيتوزان والثوم هي (مم12-35) ؛ منطقة تثبيط الكيتوزان والبصل هي (مم10-14).
الكلمات المفتاحية: الكيتين ; الكيتوزان ; مضادات حيوية ; الطريقة البيولوجية.

Résume
L'objectif de ce travail est l'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevette par voie biologique en utilisant une bactérie lactique, et l'extraction du chitosane par désacétylation de la chitine.L'utilisation de 213g de poudre de carapace nous a permis d'obtenir 95g de chitine avec un rendement de 44.6% et 22.5g de chitosane, soluble dans l'acide acétique 1%, avec un rendement de 25% avec une viscosité de 10,64 dl/g et un poids moléculaires d'environ 27MDa.
Afin d'étudier l'activité antimicrobienne du chitosane, nous avons étudié l'activité antimicrobienne des jus d'ail et d'oignon et le mélange de chaque jus avec le chitosane contre plusieurs souches pathogènes isolées à partir des urines des malades.
Les résultats ont montrés que le jus d'ail présente l'activité la plus importante suivi du chitosane dont les diamètres des zone d'inhibition sont les suivants : pour le chitosane (12-20mm) ; le jus d'ail (15-40mm); le jus d'oignon (10-18mm) ; chitosane- ail (12-35mm) ; chitosane- oignon (10-14mm).
Les mots clés : Chitine ; Chitosane ;Antimicrobien ; Bioprocédé.

Abstrat
The objective of this work is the biological extraction of chitin from shrimp shells using a lactic acid bacterium, and chitosan production by chitin deasacetylation.The use of 213g of shrimp shell powder allowed us to obtain 95g of chitin with at 44.6% and 22.5g at yield of 25%, soluble in 1% acetic acid solution with 10,64g/dl of viscosity and a molecular weight of about 27MDa.
To investigate the antimicrobial activity of chitosan, we investigated the antimicrobial activity of garlic juice and onion juice and each of them with chitosan in several pathogenic strains isolated from the urine of patients.
The results showed that garlic juice has the imore important antimicrobial activity than chitosan, the obtained results of inhibition zone are the following: chitosan (12-20mm); garlic (15-40mm); onion (10-18mm); chitosan- garlic juice (12-35mm); chitosan- onion more (10-14mm).
Key Word : Chitin ; Chitosan ; antibacterial ; Bioprocess.

Sommaire

INTRODUCTION…..1

Chapitre I : La chitine et chitosane

I.1. Historique…….3

I.2.Définition et structure de la chitine et chitosane……...5

I.3. Source de chitine et chitosane ……6

I. 4. Propriétés de la chitine et du chitosane ……..8

I. 4. 1. Propriétés physico-chimiques du chitosane……8

I. 4. 1. 1. Cristallinité……..8

I. 4. 1.2. Degré de désaceatylation du chitosane…….8

I. 4.1.3. Viscosité……9

I. 4.1. 4. Solubilité……..9

I. 4.1. 5. Réactivité……10

I. 4.2. Propriétés biologiques… ……..10

I. 4.2.1. Biodégradabilité……. ……10

I. 4.2. 2. Biocompatibilité ……11

I. 4.2. 3. Toxicité systématique …….11

I. 4.2. 4. Hémocompatibilité …….11

I.4.2.5. Cytocompatibilité……11

I. 4. 3. Propriétés antimicrobiennes ……12

Chapitre II : Méthodes d'obtention de la chitine et du chitosane

II.1.Méthodes d'extraction de la chitine……. ……14

II.1.1. Méthode chimique……14

II.1.1.1. Déminéralisation……15

II.1.1.2. La déportéinisation……15

II.1.1.3. Le blanchiment……...15

II.1.2. Méthodes biologiques…..……...16

II.1.2.1. La fermentation lactique.……16

II.1.2.2. Fermentation non-lactique.……17

II.1.2.3. Co-fermentation…….……17

II.2. Méthode d'obtention du chitosane.……..……17

II.2.1. La désacétylation de la chitine …….……18

II. 3. Les enjeux de la valorisation des produits ma.…….. …….19

II.3.1. Valeur ajoutée des coproduits marins.……...19

II.3.1.1. Les composée protéique……20
II.3.1.2. Les composée lipidiques..…….20
II.3.1.3. Les minéraux……..20

Chapitre III : Les applications de la chitine et du chitosane

III.1. Dans le domaine l'agriculture…….21
III.2. Dans le domaine du traitement des eaux uséess.…… ……...21
III.3. Les films/emballage duchitosane…….……..……..22
III.4. Dans le domaine médical…….…..…. ……22
III.5. En cosmétique…….…..……..23
III. 6. Dans le domaine matériaux…….……...24
III.7. Dans le domaine agro-alimentaire……...25
III.8. Dans le domaine textile……25
III. 9. Autres applications…….25
III. 10. Evolution des volumes de vente par domain d'application……..26

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

IV.1. Matériels…….....……...28
IV.1.1. Verrerie, appareils et produits chimiques……..……...28
IV.1.2. Matériel biologique…….……....28
IV.1.3. Les milieux utilisés.……..28
IV.2. Les méthodes.……29
IV.2.1. Procédures expérimentales..……29
IV.2.1.1. Réactivation de la souche.……29
IV.2.1.2. Préparation de la poudre de carapace.……29
IV.2.1.3. Préparation du jus de dattes.……..29
IV.2.1.4. La fermentation……..31
IV.2.1.5. Production de chitosane…….32
IV.2.2. Méthodes analytiques..……...32
IV.2.2.1. Caractérisation de la chitine et du chitosane..……32
IV.2.2.2. Analyse spectroscopique infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)…….34
IV.3. Etude de l'activité anti bactérienne……..……34

Chapitre V : Résultats et discussion

V. 1. Réactivation de la souche……..…….36
V. 2. Récupération de la chitine et production du chitosane……..36
V. 2. 1. Pour la chitine……..…….36
V. 2. 2. Production du chitosane (désacétylation de la chitine)…….37
V. 2. 3. Les quantités et les rendements de la biomasse, chitine et chitosane…….37
V. 3. Caractérisation de la chitine et le chitosane produits…….37
V. 3. 1. Test de solubilité……..37
V. 3. 2. Analyse des spectres IR de la chitine et du chitosane……..38
V. 3. 3. Détermination du poids moléculaire et de la viscosité du chitosane……..40
V. 4. L'activité antimicrobienne du chitosane…….41
CONCLUSION……... 46
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES…….48
ANNEXE

Listes des figures

Numéro	Titre de la figure	page
Fig.I. 1	Structure chimique de (a) la chitine (b) la cellulose (c)le chitosane	4
Fig.I. 2	Les différentes formes de la chitine	5
Fig. I. 3	Les sources de la chitine dans la nature	6
Fig. II. 1	Procède chimique de fabrication de chitine	14
Fig. II. 2	Désacétylation du chitosane	18
Fig. II. 3	Conversion de la chitine en chitosane par désacétylation	18
Fig. II. 4	Parts des voies de valorisation de coproduits marins en Frances	19
Fig. III. 1	Application du chitosane dans le domaine biomédicale.	23
Fig. III. 2	Différentes formes de chitosane	26
Fig. III. 3	Evaluation de la vente dans les différents domaines d'application du chitosane	26
Fig. IV. 1	Les étapes de préparation de la poudre de carapace de crevette.	31
Fig. IV. 2	Schéma illustrant la détermination de la viscosité intrinsèque en utilisant un tube à vessie.	33
Fig. IV. 3	Recherche de l'activité antimicrobienne des substances étudiées.	35
Fig. V. 1	Observation microscopique de la bactérie lactique réactivée (X100)	36
Fig. V. 2	La chitine	37
Fig. V. 3	Spectres Infra-rouge de (a) la carapace brute (b) la chitine (c) le chitosane	40
Fig. V. 4	Evolution de la viscosité réduite en fonction de la teneur en chitosane à 30°C.	41
Fig. V. 5	L'effet de différentes biomolécules : chitosane, chitosane-jus d'ail et	42
Fig. V. 6	chitosane-jus d'oignon sur différentes souches pathogènes.	43
	Evolution des diamètres des zones d'inhibitions des biomolécules étudiées en fonction des souches pathogènes	

Liste des Tableaux

Numéro	Titre de tableau	Page
Tableau I. 1	Variabilité de la teneur de la chitine chez quelques organismes	7
Tableau I. 2	Les concentrations minimales d'inhibition de quelques bactéries par le chitosane	12
Tableau III. 3	Répartition de l'utilisation du chitosane par pays et par domaine d'application, en tonnes, en 2006	27
Tableau IV. 4	Les conditions optimales de l'extraction biologique de la chitine	31
Tableau V. 1	Les quantités et les rendements de la biomasse, chitine et chitosane	37
Tableau V. 2	Solubilité du chitosane	38

Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléiques

Al : allongement

ARN : Acide Ribonucléiques

CHS : Chitosane

DA : D'acétylation

DCO : demande chimique en Oxygène

DD : Désacétylation

DDA : degré de désacétylation

DHA : Acide docosahexaénoïque

DL 50 : Dose létale 50%

EPA : Acide eicosapentaénoïque

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Int : Intérieure.

IR : Infrarouge

MES : Matières en suspension

MRS : Man, Rog osa et Sharp

NAG : N-aétylgucosaminides.

PEG : Polyéthylène glycol.

Pka : Constante d'acidité.

Red : Réduite.

Sp : Spécifique.

Introduction

« Biomolécules » est un terme couramment utilisé pour les molécules qui sont synthétisées ou extrait à partir des organismes vivants. Les biomolécules peuvent être des polysaccharides d'origine végétale (la cellulose), d'origine animale ou microbienne (la chitine) ou une protéine dotée d'activité enzymatique (catalase). Elles sont biologiquement renouvelables, biodégradables et biocompatibles.

La chitine est une de ces biomolécules. Elle se retrouve dans les carapaces des animauxmarins invertébrés, tels la crevette et le homard, les carapaces des insectes de même que dansles champignons et les levures (Rinaudo, 2006). La chitine, combinée à du carbonate de calcium et à certaines protéines, forment un exosquelette solide pour plusieurs invertébrés. Celui-ci est composé généralement de 30%-40% de protéines, de 30%-50% de carbonate de calcium et de 20%-30% de chitine sur une base sèche (Percot et al., 2002). Dans sa structure, la chitine est souvent liée aux autres constituants majeurs de la carapace, formant des liens covalents avec les protéines et une matrice complexe renfermant du carbonate et du phosphate de calcium (Muzzarelli, 1977). La présence de certains pigments, particulièrement de l'astaxanthine, donnela couleur rose-orangée des carapaces.

La chitine est extraite de la carapace de crevettes principalement pour la transformer en chitosane. On retrouve aujourd'hui une multitude d'applications au chitosane dans plusieurs domaines. Il possède des propriétés antibactériennes et antifongiques pouvant être mises àprofittant en agriculture qu'en alimentation (No et al., 2002 ; Shahidi et al., 1999). Des films à base de chitosane peuvent être appliqués sur des aliments afin de préserver leur intégrité (de Britto et de Assis, 2007). Le chitosane sert aussi d'immunostimulateur, d'agent antifongique et dechélateur de métaux (Gamage et Shahidi, 2007), de gras et d'autres matières organiques, éliciteur de réactions de défense chez les plantes, employé dans la lutte contre le cancer pour ne nommer que ceux-ci.

L'extraction de la chitine passe par deux étapes : la déminéralisation et la déprotéinisation. Cette isolation peut se faire par deux méthodes : chimique et biologique.

La méthode chimique nécessite l'utilisation des acides et des bases, alors que la méthode biologique fait appel à des bactéries lactique. Ces bactéries ont la capacité de produire l'acide lactique conduisant ainsi à la déminéralisation et d'excréter des enzymes protéolytiques conduisant à la déprotéinisation des carapaces de crustacés.

L'objectif de notre travail était de préparer le chitosane par une désacétylation chimique douce de la chitine. Par la suite, une étude de l'effet antimicrobien du chitosane produit, le mélange chitosane-jus d'ail et chitosane-jus d'oignon a été réalisée.

Ce mémoire est structuré en deux parties :

1. Une étude bibliographique, organisée en trois chapitres :

- ✓ Le premier chapitre présente des généralités sur le chitine et chitosane : définitions, les propriétés, et les structures.
- ✓ Le deuxième chapitre étude les méthodes d'obtention de chitine et chitosane.
- ✓ Le troisième chapitre décrit les domaines d'applications de chitine et chitosane.

2. Une étude expérimentale, organisée en deux chapitres :

- ✓ Le quatrième chapitre est consacré aux produits utilisé, méthodes expérimentales de synthèse, et les différentes techniques de caractérisations employées.
- ✓ Le cinquième chapitre illustre les résultats obtenus, suivi des interprétations et discussions.

Enfin, une conclusion générale sera présentée. Elle résumera les principaux résultats obtenus lors de ce travail de mémoire et donnera différents perspectives pour les études futures.

Chapitre I : Chitine et Chitosane

I. 1. Historique

En 1811 le Pr.H.Braconnot, directeur de jardin biologique à Nancy(France) a isolé une substance fibreuse à partir d'un champignon, il observa que cette substance n'était pas soluble dans les solutions aqueuses d'acides. Une décennie plus tard, En 1823, la même substance a été trouvée dans les insectes (coléoptère) et a été ensuite nommée chitine (provient du mot grec ''*Kitos*'' que signifie l'enveloppe).En 1859, le Pr .C.Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin et a observé sa solubilité ; la substance résultante du traitement alcalin a peut être dissoute dans les acides.

En 1894, cette substance fut nommée Chitosane par Hoppe-Seyler (Winterowd et al., 1995).

Entre 1930 et 1940, ces biopolymères ont suscité beaucoup d'intérêt dans le monde oriental, principalement pour l'application dans le domaine médical et la purification de l'eau.

Cependant, les recherches se sont accélérées après la seconde guerre mondiale pour s'amplifier à partir des années 70(Blackwell et al., 1973;Winterowd etal., 1995). Le chitosane a commencé à susciter un réel intérêt en raison notamment des grandes quantités de déchets disponibles que produisaient les conserveries de crustacés.

Les gouvernements, notamment American et Japonais, ont alors cherché à valoriser ces déchets et ont lancé les premiers programmes nationaux de recherche. Le premier Congrès International a eu lieu en 1977 à Boston aux Etats Unis. La $10^{ème}$Conférence Internationale sur le chitosane qui s'est tenue en septembre 2006 à Montpellier (France) a montré l'importance de la communauté scientifique travaillant sur le chitosane à travers le monde.

Aujourd'hui, nous savons que la chitine et le chitosane sont les biopolyméres les plus abondants dans la nature après la cellulose (Kurita et Rinaudo, 2006) et provenant d'une ressource naturelle renouvelable (Muzzarelli, 1977) et bon marché. La production annuelle de chitine dans la nature est estimée à 10^9-10^{10} tonnes et actuellement, elle n'est pas très exploitée et moins commercialisée que la cellulose (Peter, 2002).

I.2. Définition et structure de la chitine et du chitosane

La chitine est un polymère formé d'une répétition d'unités de N-acétyl-D-glucosamine. C'est le second composé organique le plus abondant, après la cellulose, sur la Terre (Muzzarelli, 1977). En fait, la seule différence entre les deux polymères au niveau moléculaire est la présence du groupement acétylamine en position -2- dans la chitine qui remplace le groupement alcool retrouvé dans la cellulose (Fig. I. 1).

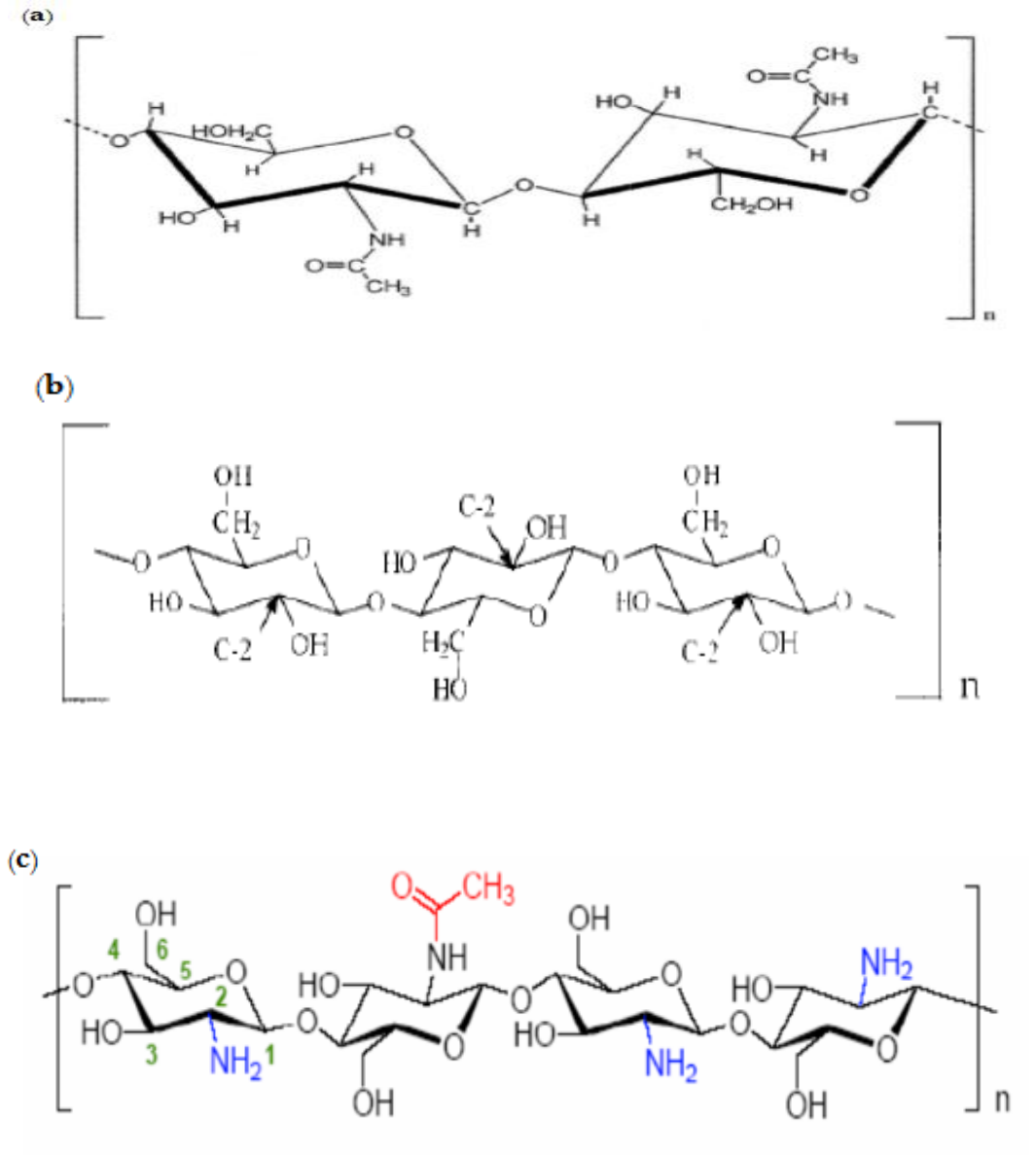


Fig. I.1. Structure chimique de (a) la chitine (b) la cellulose (c) le chitosane (Nugraha, 2006; Andrade, 2012).

La présence d'un groupement amine sur les oses de la chaîne fait de la chitine et du chitosane, son produit de transformation, les seuls sucres cationiques. Le chitosane se distingue de la chitine par l'élimination du groupement acétyle. Ce changement expose la fonction amine qui peut ainsi accepter un proton et devenir chargée positivement. Cette modification permet au chitosane d'être soluble dans des solutions de pH inférieur à 6,2. La frontière entre la chitine et le chitosane n'est pas bien définie puisque la chitine contient souvent certains groupements désacétylés et vice-versa pour le chitosane. Une des

caractéristiques pour distinguer les deux polymères est le degré de désacétylation nécessaire pour permettre une solubilisation du chitosane dans une solution acide qui est autour de 50% (Lévesque, 1995). D'autres n'appellent chitosane que les polymères de chitine désacétylés à plus de 75% (Khan, 2002).

On retrouve la chitine dans les carapaces des animaux marins invertébrés, tels que : la crevette et le homard, les carapaces des insectes de même que dans les champignons et les levures (Rinaudo, 2006). La chitine, combinée à du carbonate de calcium et à certaines protéines, forment un exosquelette solide pour plusieurs invertébrés. Celui-ci est composé généralement de 30%-40% de protéines, de 30%-50% de carbonate de calcium et de 20%-30% de chitine sur une base sèche (Percot et al., 2002). Dans sa structure, la chitine est souvent liée aux autres constituants majeurs de la carapace, formant des liens covalents avec les protéines et une matrice complexe renfermant du carbonate et du phosphate de calcium (Muzzarelli, 1977). La présence de certains pigments, particulièrement de l'astaxanthine, donne la couleur rose-orangée des carapaces.

La chitine se retrouve naturellement sous 3 formes polymorphes (α, β et γ) qui diffèrent selon l'arrangement des chaînes (Rinando, 2006). La chitine-α, dont les chaînes sont antiparallèles, est la plus stable et la plus abondante dans la nature. Sa structure est formée par le repliement des chaînes de chitine sur elles-mêmes (Fig. I. 2).

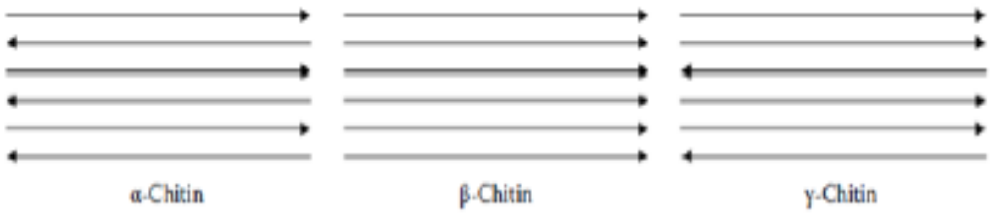


Fig. I. 2. Les différentes formes de la chitine (Arbia, 2013)

Contrairement à la chitine-β, la chitine-α est beaucoup plus cristalline (Lavall, 2007) et présente une seconde bande amide I près de 1660 cm^{-1} en spectroscopie infrarouge (Sun, 2006). La présence de plusieurs liens hydrogène inter-chaînes parallèles amène la formation de feuillet. D'autres liaisons hydrogènes inter-feuillets provoquent une résistance au gonflement dans l'eau. C'est cet arrangement de la chitine qui donne sa cristallinité.

Comme la chitine, le chitosane est un biopolymère, naturel et non toxique, est actuellement largement produit commercialement à partir des déchets des carapaces de crabes et des crevettes.

Généralement, le chitosane a trois types de groupes fonctionnels, un groupement amine et deux groupement hydroxyles en positions C_2, C_3 et C_6 respectivement (Fig. I. 1). Grace à ses groupements amines libres, ce composé de propriétés très intéressantes. Le chitosane, soluble dans les acides faibles, possède une charge positive alors que la plupart des polysaccharides sont chargés négativement (Shahidi et al., 1999).

I.3. Source de chitine et chitosane

La chitine est produite par les insectes (blattes, coléoptères, fourmis), les arachnides (scorpions, araignées), les animaux marins (crabes, crevettes, homards, langoustines, calamars) et les champignons (basidiomycètes…) (Di Mario et al., 2007). Dans le règne animal, la chitine est un élément de soutien des téguments de certains invertébrés (insectes, crustacés, mollusques et nématodes) (Fig. I. 3).

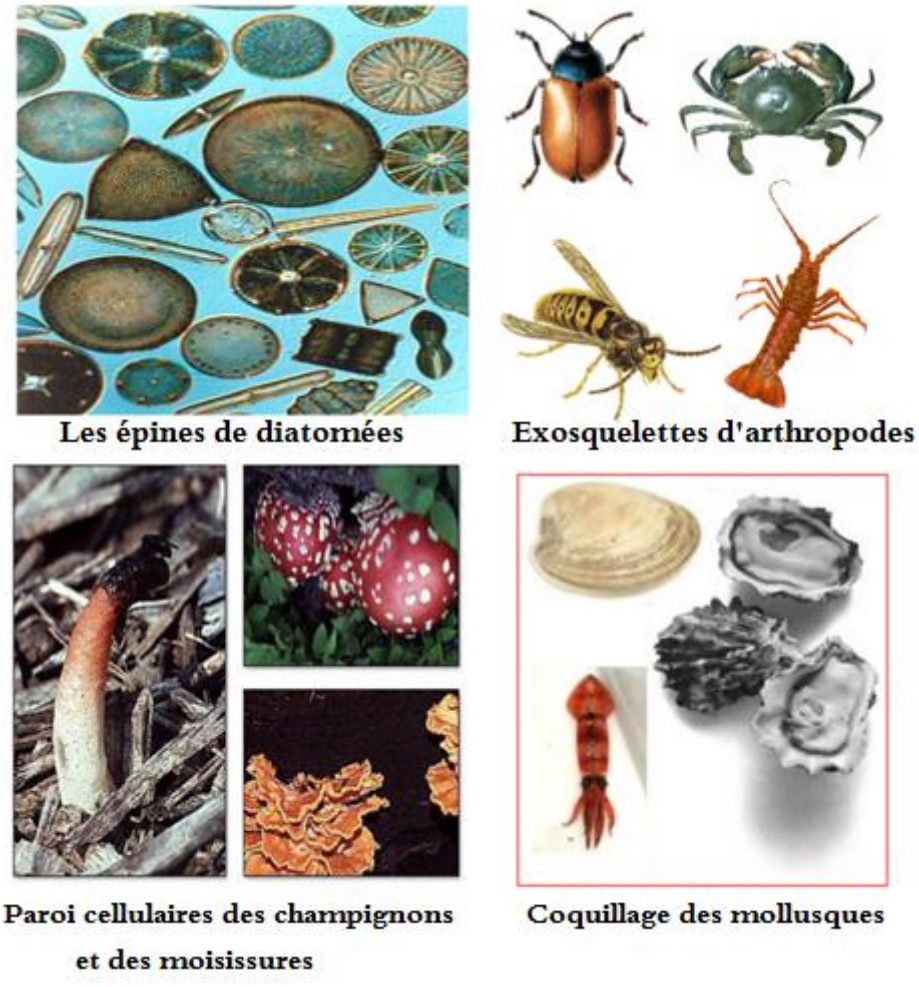


Fig. I. 3. Les sources de la chitine dans la nature

On la retrouve, en particulier, dans la composition de leur cuticule, et à un degré moindre au niveau de la paroi intestinale, du tube digestif, des trachées, des tendons musculaires et du squelette interne. Cette cuticule contient, également, des protéines, des lipides et du carbonate de calcium. En réalité, les structures chitineuses ne sont jamais constituées de chitine seule ; elle est généralement complexée à des protéines sous la forme de glycoprotéines, ce qui confère des propriétés de rigidité (ou de souplesse) aux cuticules. La chitine est, également, un constituant majeur des endosquelettes de céphalopodes comme les sèches et les calamars et des parois de certaines levures (Arbia, 2015). Le tableau I. 1, donne les principales sources de chitine.

Les carapaces de crustacés contiennent environ 30-40% de protéine, 30-50% de carbonate de calcium, et 20-30% de chitine par rapport au poids sec (Tolaimate et al., 2003). Les teneurs en chitine varient d'une espèce à l'autre (tableau I.1) montre les écartes qui existent selon les ressources disponibles pour produire la chitine.

Tableau I.1. Variabilité de la teneur de la chitine chez quelques organismes (Zhenwang, 200 ; Norseth, 1981)

Source	**Teneur en chitine (% matière sèche)**	**Source**	**Teneur en chitine (% matière sèche)**
Arthopodes	2à72	Crabes *chinoecetes oplio*	26.6
Mollusques	6à40	Crevettes *panadallus borelis*	17.0
Ponophores	33	Ecrevisses *procambrus*	0.2à38
Cnidaires (capsules œufs)	3à30	Bouquet	4à29
Annélides	0.2à38	Plume de calmar	2.9à20.1
Brachiopodes	4à29	Krill *Euphasia supaereb*	Faible
Champignons	2.9à20.1	Algues /Lichen	Faible

Chez les insectes, la chitine constitue environ 1,5% de la masse fraîche de l'animal, ce qui explique que son exploitation commerciale ne soit pas envisagée (Kiefer, 1999). Chez les micro-organismes, le pourcentage de chitine peut atteindre plus de 20% de la masse fraîche de la cellule (Wu et al., 2004). Toutefois, l'extraction à partir de micro-organismes n'a, jusqu'ici, été effectuée qu'à titre expérimental. Le meilleur rendement d'extraction de la chitine est,

actuellement, observé chez les crustacés qui en constituent donc la principale source au niveau industriel.

Environ 70% des pêches de capture marines sont utilisées pour la transformation et une quantité considérable de la capture traitée est éliminée sous forme de déchets. Les rejets dépassent 20 millions de tonnes par an, ce qui est l'équivalent de 25% de la production annuelle (Jo et al., 2011**)**. Chez la crevette, seulement 35% de la masse de l'animal est consommé tandis que cette proportion est d'environ 45% pour les crabes et les homards. Les déchets de crustacés sont constitués, principalement, de 30- 40% de protéines, 30- 50% de carbonate de calcium et de 20- 30% de chitine (Hobel, 2004; Kurita, 2006 ; Crini et al., 2009;Jo et al., 2011) (Tableau I. 2) avec d'autres composants tels que les lipides, les pigments (caroténoides et astaxanthine) et d'autres sels minéraux qui peuvent également être valorisés. La proportion de chitine dans les déchets de crustacés justifie donc son utilisation commerciale comme matière première pour obtenir la chitine et le chitosane.

I. 4. Propriétés de la chitine et du chitosane

I. 4.1. Propriétés physico-chimiques

I. 4. 1.1. Cristallinité

Le Chitosane est une substance semi-cristalline. Il cristallise dans le système orthorhombique ; deux types de structures sont connus : le chitosane I (sous forme de sel) correspondant à un faible degré de désacétylation DD (60 %). Il est plus désordonné que le chitosane II (forme amine libre) qui possède un fort degré de désacétylation DD (90 %) (Winterowd et Sandford, 1995 ; Hudson et Jenkins, 2003 ; Kurita, 2006).

I.4. 1. 2. Degré de désacétylation

En dépit de leur désignation chimique spécifique, les noms chitine et chitosane correspondent actuellement à la même famille de polymère. Ils varient seulement sur le contenant en groupe acétyle qui est désigné par le degré d'acétylation. Le degré d'acétylation présente le taux de groupe acétylé par rapport au groupe non acétylé (Fig. I.1) (Jalal, 2005).

Le degré de désatylation (DD) est l'un des propriétés les plus importantes du chitosane. Il influe, non seulement sur les caractéristiques chimiques et physiques, mais aussi sur la biodégradation et l'activité immunologique du chitosane (Chatelet et al., 2001).

Dans les 30 ans passés, beaucoup de méthodes ont été développées pour la détermination du DD, y compris la spectroscopie infra rouge, la spectroscopie U-V, la résonance magnétique nucléaire, la titration colloïde et la titration potentiométrique (Xuan, 2003 ; Acharya et al.,

2004).Cependant, la méthode la plus simple est celle de la spectroscopie IR proposée par Khan et ses collaborateurs (2000).

I. 4.1.3. Viscosité

La viscosité du chitosane dépend du degré d'acétylation de ce polymère. Plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amines libres, plus le chitosane est soluble et par voie de conséquence sa viscosité est plus importante (Wang et Xu, 1994). La viscosité dépend également : de la concentration du polymère (elle augmente avec la concentration), de la température (elle chute lorsque la température augmente) (Chen , 1998), du poids moléculaire (la viscosité intrinsèque augmente en fonction de l'augmentation du poids moléculaire) (Berth et al., 1998) et enfin du pH (plus il est bas plus la viscosité est élevée).

Pour déterminer la viscosité, il existe différentes méthodes. La plus employée est «la viscosimétrie». Elle nécessite la connaissance des paramètres K et a de la relation de Mark-Houwink (Amiali, 1999).

$$[\eta] = K.M^a$$

[η] : la viscosité intrinsèque.

M : le poids moléculaire moyen du polymère.

K et a : des paramètres qui dépendent du système polymère-solvant à une température donnée.

I. 4. 1.4. Solubilité

La solubilité d'un polymère est liée aux interactions intra et inter moléculaire entre les chaînes (Ueno et al., 2001), la densité de charge de la chitine implique son caractère hydrophobe. Par conséquent, elle n'est pas soluble dans les solvants classiques. Les acides concentrés, de préférence à chaud, et certains solvants toxiques sont capables de solubiliser la chitine. Leur utilisation est dangereuse pour l'opérateur et dégradent la structure de la chitine et du chitosane (Shi et al., 2006).Ceci constitue l'inconvénient majeur qui limite l'utilisation de la chitine et rend difficile sa caractérisation (Varum, 1997; Onishi et Machida, 1999).

L'acide phosphorique (H_3PO_4) est un acide alimentaire également capable de solubiliser la chitine (Hein et al., 2007).La chitine est dissoute à 55°C, parle H_3PO_4à 0,5 M, dans un ratio w/v de 1:200 et pendant 1 h. La solubilisation du chitosane est davantage accessible par des solvants acides, à un pH < 6,5correspondant au pKa du chitosane. La présence des groupements protonés (NH^+_3) modifie la densité de charge de la molécule. Par

conséquent, la solubilisation dépendra du DA, ainsi que de la nature du solvant (Rao et Sharma, 1997).

La masse molaire, la polydispersité et la solubilité de la chitine et ses dérivés ont un impact direct sur leur comportement rhéologique. Par exemple, la viscoélasticité et le volume molaire sont affectés. La concentration en polymère dans le solvant est également importante. Il existe une concentration critique, dite d'enchevêtrement ou de recouvrement, au-delà de laquelle les pelotes de macromolécules s'interpénètrent. Cette concentration dépend de la masse molaire et du degré d'acétylation (Muzzarelli et al.,2001; Crini, 2006).

I.4.1.5. Réactivité

La présence de nombreux groupes hydroxyle confère au polymère un caractère hydrophile intéressant qui sera très utile pour des propriétés d'adsorption dans des solutions aqueuses et pour quelques réactions catalytiques. Cependant, le groupe réactif le plus important pour la conception de catalyseurs supportés est le groupe amine porté par le chitosane. Ces groupes amine sont très réactifs pour la fixation des métaux et leur action peut passer par différents mécanismes.

Le pKa des groupes amine du chitosane dépend fortement du degré de désacétylation et du degré de neutralisation de ces groupes fonctionnels. Sorlier et ses collaborateurs, ont trouvé que le pKa varie entre 6,4 et 7,2. Il augmente en fonction du degré d'acétylation ; pour un chitosane faiblement acétylé le pKa est voisin de 6,4. En général, en milieu acide, la plus part des groupes aminés sont protomés, ce caractère cationique est à l'origine de la fixation de différents anions tels que les colorants anioniques et les complexes d'anions métalliques (sorlier et al2003).

I. 4.2.Propriétés biologique

I. 4.2.1.Biodégradabilité

La dégradation biologique de la chitine est réalisée par une série d'enzymes : chitinases, lysozyme et glucanases (Shigemasa et al., 1994; Chih-Min et al., 2002; Yang et al., 2004). Parmi les chitinases, les endo-chitinases (Laura et al., 2006) hydrolysent le polymère de façon aléatoire pour produire des dimères et des trimères de N-acétylglucosamine (NAG), tandis que les exo-chitinases (Laura et al., 2006) hydrolysent la chitine de haut poids moléculaire en produisant uniquement des dimères de NAG. Finalement, les N-acétylglucosaminidases aussi appelées chitobiases ou N-acétyl hexoaminidases hydrolysent les dimères de NAG et parfois

le NAG des extrémités non-réductrices des chaînes de chitine pour produire des monomères de NAG (Plouffe, 1997).

I. 4.2.2. Biocompatibilité

La chitine n'a aucun caractère antigénique et de ce fait elle est parfaitement compatible avec les tissus vivants. Son caractère antithrombogène et hémostatique confirme sa possibilité d'emploi dans tous les domaines de la biologie (Bal et al., 2006 ; Juraj et al., 2007).

I. 4.2.3. Toxicité systémique

Dans le cas d'administration orale, la dose létale DL_{50}dépasse les 16 g/Kg/jour chez la souris, soit une dose supérieure à celle du saccharose (12 g/Kg/jour). L'administration sous-cutanée de chitosane conduit à une valeur de DL_{50} supérieure à 10 g/Kg/jour chez la souris.

Globalement, pour des doses administrées adéquates, la non-toxicité du chitosane est admise que ça soit pour des applications diététiques et cosmétiques, chez l'homme et certains animaux (Rao et al., 1997).

I. 4. 2. 4. Hémocompatibilité

Si le chitosane montre une activité hémostatique particulièrement sous forme d'un solide de haute masse, les oligomères de chitosane et le chitosane hydrolysé de faible masse molaire soluble dans l'eau ne présentent aucune activité thrombogène (Malette et al.,1983).Notons que l'hémocompatibilité, correspond à la mesure du degré et de la durée des altérations de l'hémostase causée par un biomatériau.

Le chitosane a la capacité d'induire la formation d'un coagulât lorsqu'il est en contact avec des érythrocytes, même dans le cas du sang héparine (Klokkevold et al., 1999). Cet effet hémostatique du chitosane est attribué à un mécanisme indépendant de la cascade de coagulation classique. Il entraîne l'agglutination des érythrocytes de toutes les espèces, certainement en raison de ses propriétés poly-cationiques qui interfèrent avec la surface chargée négativement des cellules (Rao et Sharma, 1997).

L'activité du chitosane peut être modulée en modifiant chimiquement le polymère. Un effet anti-thrombogène est ainsi obtenu après N-acétylation avec de longues chaines carbonées (Lee et al., 1995).

I. 4. 2. 5. Cytocompatibilité

La cytocompatibilité du chitosane vis-à-vis des fibroblastes, des kératinocytes, des chondrocytes et des ostéoblastes a été démontrée in vitro. Des travaux montrent que, quel que soit le DA (2-50%), la mise au contact prolongée de films de chitosane avec les deux premiers

types de cellules n'induit ni la destruction, ni la croissance anarchique de celles-ci, et qu'aucune substance cytotoxique n'est larguée dans le milieu (Chatelet et al.,2001).Le même comportement est constaté dans le cas de cultures de chondrocytes et de kératinocytes sur un film de chitosane de DA 2,5% (Denuzière,1998) ainsi que la culture de chondrocytes et d'ostéoblastes sur une surface similaire de DA 10% (Lahiji et al.,2000).Lors de cultures cellulaires sur un film de chitosane, la croissance des cellules dépend des caractéristiques et de la source du chitosane (Cid et al., 2000 ;Ramos et al.,2000).

I.4. 2. Propriétés antimicrobiennes

Le chitosane présente des propriétés très intéressantes, il est non-toxique, biodégradable, renouvelable, antibactérien et antifongique. Plusieurs travaux de recherches ont illustré l'activité anti-bactrienne du chitosane. Ainsi, Helander et al. (2001) ont montré que l'utilisation du chitosane à forte concentration a un effet bactéricide sur des bactéries Gram négatif comme *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*. Ouattara et al. (2000) ont montré que des films obtenus à partir d'une solution du chitosane présentent un effet inhibiteur sur les bactéries lactiques tel que *Lactobacillus sakei*. L'enrobage des fruits par le chitosane a également permis l'inhibition de la croissance la bactérie à Gram positif et *Candida lambica* (Devlieghere et al., 2004). Le chitosane agit sur les bactéries à Gram positif et sur les bactéries à Gram négatif, cependant, son action sur ces dernières est moins importante que celle qui est sur les bactéries à Gram positif (No et al., 2002 ; Coma et al., 2003). Le Tableau I. 2, présente les concentrations minimales d'inhibition de quelques bactéries.

Tableau I. 2. Les concentrations minimales d'inhibition de quelques bactéries par le chitosane (Liu et al., 2001)

Bactéries	**CMI (ppm)**
Bacillus cereus	1000
Agrobacterium tumefaciens	100
Pseudomonas fluorescens	500
Escherichia coli	20
Micrococcus luteus	20
Staphylococcus aureus	20

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

- ✓ La formation de liaisons électrostatiques entre les charges positives du chitosane (transformation des motifs NH_2 du chitosane en motifs NH_3^+ en milieu acide) et les phospholipides de la membrane cellulaire qui ont une charge négative, perturbant ainsi les échanges entre la cellule microbienne et le milieu extérieur (Bégin et Calsteren, 1999 ; Liu et al., 2001 ; Devlieghere et al., 2004 ; Qin et al., 2005 ; Peng et al., 2005; Yang et al., 2005) ;
- ✓ La présence du chitosane peut aussi entraîner des déformations morphologiques au niveau de la membrane cellulaire (Laflamme et al., 1999 ; Roller et Covill, 1999, Helander et al., 2001 ; Choi et al., 2001) ;
- ✓ L'inhibition peut aussi être due à l'enrobage des cellules microbiennes par le chitosane, éliminant ainsi toute échange avec le milieu extérieur (Muzzarelli et al., 2001) ;
- ✓ L'action du chitosane peut aussi se faire par formation de liaison avec les protéines et les électrolytes présents dans le cytoplasme (Laflamme et al., 1999 ;Choi et al., 2001) ;
- ✓ Formation des liaisons entre le chitosane et l'ADN des bactéries et l'inhibition de la synthèse du RNAm (Devlieghere et al., 2004 ; Liu et al., 2001) ;
- ✓ Le chitosane peut aussi agir de façon indirecte sur les bactéries et les moisissures, et cela par complexation des métaux nécessaires pour leur croissance (Roller et Covill 1999).

Chapitre II : Méthodes d’obtention de la chitine et chitosane

La chitine a une structure chimique variable ; elle englobe plusieurs polysaccharides composés de 50 à 100% d'unités de N-acétyl-β-D-glucosamine de et de 0 à 50% d'unités D-glucosamine. La chitine est présente dans les coproduits sous forme de complexe chitine – protéines-minéraux (principalement du carbonate de calcium). L'extraction de la chitine de la carapace peut se faire par deux méthodes : la méthode chimique et la méthode biologique.

II. 1. Méthode d'extraction de la chitine

II.1. 1. Méthode chimiques

La grande disponibilité des carapaces de crevettes et leur teneur élevée en chitine en font la source principale de ce produit. L'extraction de la chitine de la carapace nécessite au moins deux étapes distinctes lorsque l'on procède par méthode chimique : la déminéralisation en milieu acide et la déprotéinisation en milieu basique (Fig. II. 1). Ces deux processus peuvent être effectués dans n'importe quel ordre, mais l'efficacité de la réaction effectuée en premier est toujours moindre. Pour obtenir un produit possédant un minimum de protéines, il est préférable de déminéraliser d'abord puis d'effectuer la déprotéinisation. Bien que la chitine soit résistante aux acides et aux bases, celle-ci peut être légèrement détériorée par les deux traitements (Percot et al., 2002).

II.1. 1. 1. Déminéralisation

La déminéralisation de la chitine s'effectue habituellement avec une solution d'acide diluée, généralement du HCl, afin de transformer les minéraux non solubles de la carapace en sels solubles. Le carbonate de calcium, principal composé minéral de la carapace en réagit avec le HCl pour former du chlorure de calcium, de l'eau et du gaz carbonique comme décrit dans la réaction suivante :

$$2\,HCl_{(aq)} + CaCO_3 \xrightarrow[(aq)]{} CaCl_{2(aq)} + H_2O_{(l)} + CO_{2(g)} \quad \ldots\ldots(1)$$

La plupart des autres minéraux présent réagissent de façon similaire et donnent des sels solubles en présence d'acide. Les sels formés peuvent être séparés de la chitine par simple filtration suivie de lavage.

D'autres facteurs peuvent aussi influencer la réaction dont le facteur temps-température. Une température plus élevée accélèrera réaction qui nécessite donc moins de temps et permet une meilleure pénétration du solvant dans la matrice de chitine. La pénétration du solvant dans la matrice est aussi influencée par la taille des particules de chitine. Généralement, la réaction se termine avec la disparition du dégagement gazeux. (Lévesque, 1995). Suite au traitement, la

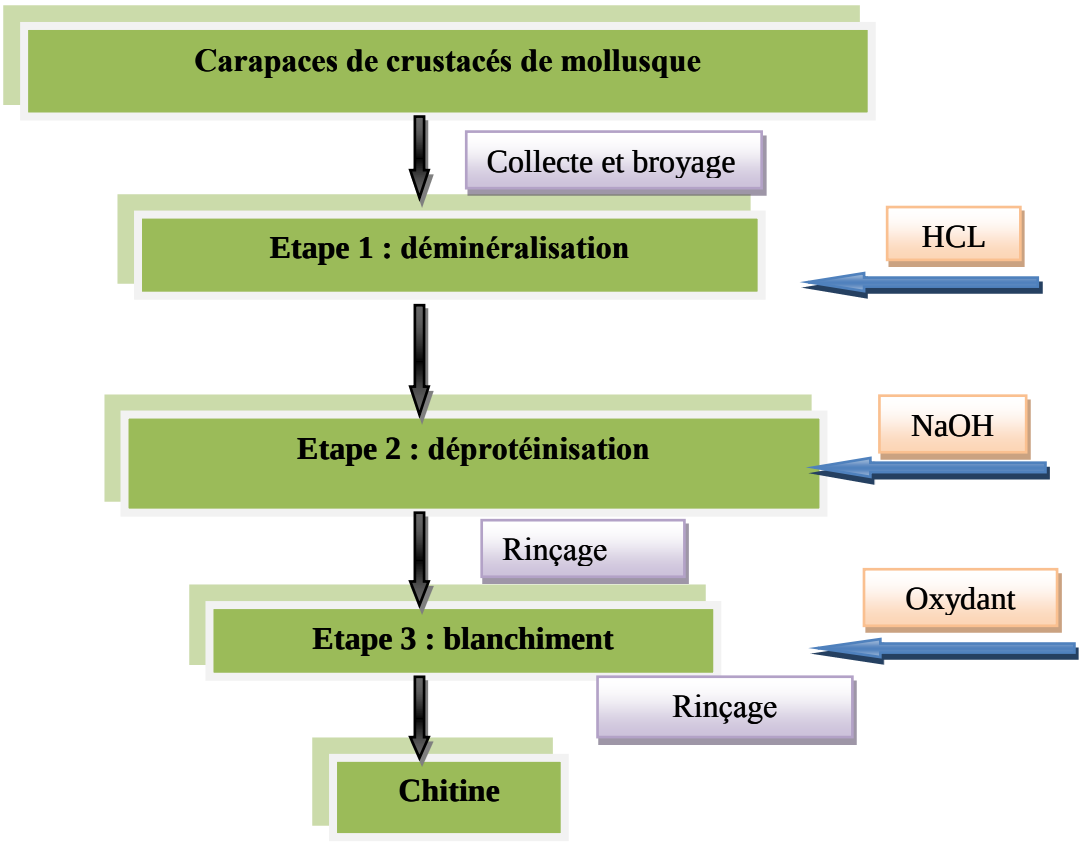


Fig. II.1. Procédé chimique de fabrication de chitine d'après Onsoyen et Skaugrud, 2007

poudre doit être lavée et filtrée jusqu'à l'obtention d'un résidu neutre. La neutralisation est important, car l'acide résiduel dans la matrice sèche sera concentré et pourra endommager la chitine.

II. 1. 1. 2. La déprotéinisation

La déprotéinisation de la chitine consiste à solubiliser les protéines présentes dans la matrice de la chitine dans une solution aqueuse.

L'emploi de soude à température élevée est généralement utilisé pour solubiliser une plus grande partie des protéines. Plusieurs études font état de divers protocole afin d'optimiser le processus (Percot et al., 2002 ; Synowiecki et Al-Khteeb, 2003).Mais aucun procédé n'est parvenu à éliminer entièrement les protéines dans une période inférieure à six heures. Dans les meilleurs cas, il reste toujours quelques résidus protéiques attachés à la chitine. Il semble que les liens entre les protéines et la chitine différent d'une espèce à l'autre et que le traitement doit varier.

II. 1. 1. 3 Le blanchiment

Pour les applications industrielles, la chitine obtenue à partir des ressources crustacées doit être décoloré après les traitements acide et alcalin (Knorr, 1984 ; No et al., 1989). Le pigment dans les carapaces de crustacées forme un complexe avec la chitine. Le blanchiment est souvent réalisé par un traitement avec des agents oxydants ($KmnO_4$, $NaHSO_3$, $Na_2S_2O_4$ ou H_2O_2). Ce traitement peut éliminer des traces de pigments résiduels, comme les caroténoïdes.

II. 1. 2. Méthode biologique

Une méthode alternative pour résoudre les problèmes d'extraction chimique de la chitine consiste en utilisation de la méthode biologique. L'utilisation des protéases pour la déprotéinisation permettait d'éviter un traitement alcalin. En plus, de l'utilisation des exoenzymes, les bactéries protéolytiques ont été utilisées pour la déprotéinisation des carapaces déminéralisées. Ils peuvent utiliser des enzymes purifiées ou des microorganismes entiers sans provoquer l'hydrolyse ou la désacétylation de la chitine (Synowiecki et Al-kateeb. 2000 ; Holanda et netto, 2006 ; Jung et al., 2007; Gallet et al., 2008 ; Vàsquez et al., 2013 ; Arbia et al., 2013). Cette approche biotechnologique, conduit à la formation d'une fraction liquide riche en protéines, en sels minéraux et en pigments et une fraction solide riche en chitine. La fraction liquide peut être utilisée comme supplément protéines-minéraux pour la consommation humaine ou pour l'alimentation des animaux (Rao et al., 2000).

II. 1. 2. 1. Fermentation lactique

Les procédés biologiques pour la production de chitine réalisés actuellement, utilisent des bactéries productrices des acides organiques et des enzymes pour la déminéralisation et la déprotéinisation des carapaces de crustacés, respectivement. Différentes sources de chitine et différents substrats ont été testés.

La déminéralisation biologique des carapaces de crevette fait intervenir l'acide lactique produit, par hydrolyse de la source de carbone présente dans le milieu de fermentation par la bactérie lactique. Cette acidification a pour effet d'éviter les contaminations et de déminéraliser les carapaces par solubilisation des minéraux. La réaction de l'acide lactique avec le carbonate de calcium conduit à la formation du lactate de calcium qui peut être éliminé par un simple lavage (Rao et al., 2000). La déprotéinisation de ces déchets biologiques et la liquéfaction simultanée des protéines des carapaces de crevettes se font, essentiellement, par des enzymes protéolytiques produites par le lactobacille additionné, les bactéries présentes dans le système digestif des crevettes ou par les protéases présentes dans

les déchets (Rao et al., 2000). Il en résulte une fraction riche en peptides solubles et en acides aminés libres (Fagbenro, 1996).

La fermentation lactique combinée au traitement chimique a été étudiée comme une méthode alternative à l'extraction chimique de la chitine, dans le but de réduire les quantités d'acide et de base utilisées (Luis et al., 2002). Ces auteurs considèrent la fermentation lactique comme un prétraitement des déchets de crevettes, suivi par une déminéralisation et une déprotéinisation utilisant de faibles concentrations en HCl (0.5 M) et en NaOH (0.4 M).

II. 1. 2. 2. Fermentation Non- lactique

Des bactéries non lactiques ont été, également, utilisées pour la récupération de la chitine. Parmi les bactéries utilisées on cite *Bacillus subtilis* (Sini et al., 2007), *Pseudomonas aeruginosa* K-187 et *P. maltophilia* (Wang et Chio, 1998), *Serratia marcescens* FS-3 (Jo et al., 2008), *Bacillus cereus* et *Exiguobacterium acetylicum* (Sorokulova et al., 2009), *Bacillus* sp. TKU004 (Wang et al., 2006), *Aspergillus niger* ATCC 16513 (Mahmoud et al., 2007).

II. 1. 2. 3. Co-fermentation

L'extraction de la chitine en utilisant des co-fermentation ont été réalisées par plusieurs chercheurs parmi on cite : le processus de fermentation en deux étapes impliquant une première étape de déprotéinisation anaérobie au moyen de la flore autochtonique issue des carapaces de crevette et/ou une bactérie protéolytique, suivies par une fermentation homolactique utilisant *L. casei* MRS1 dans la deuxième étape (Xu et al., 2008). Différentes stratégies ont été appliquées pour extraire la chitine à partir des déchets de crevette utilisant la bactérie lactique *L. lactis* et la bactérie marine *Teredinobacter turnirae* productrice de protéase (Aytekin et al., 2009).

Une co-fermentation de *L. paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 et *Serratia marcescens*FS-3, a été testée dans le but d'extraire la chitine à partir des déchets de crabe rouge en une seule étape (Jung et al., 2007).

II. 2. Méthode d'obtention du chitosane

La désacétylaion de la chitine est l'étape la plus délicate dans la production du chitosane. Elle nécessite la substitution des groupements acétyles, par voie chimique ou enzymatique, pour aboutir au chitosane (Fig. II. 2), ce qui peut entraîner une réduction excessive de la longueur de la chaîne du polymère. En jouant sur la durée du traitement alcalin et sur l'élévation de

température, il est donc possible d'obtenir différents chitosane à partir d'une même chitine (Djelad, 2010).

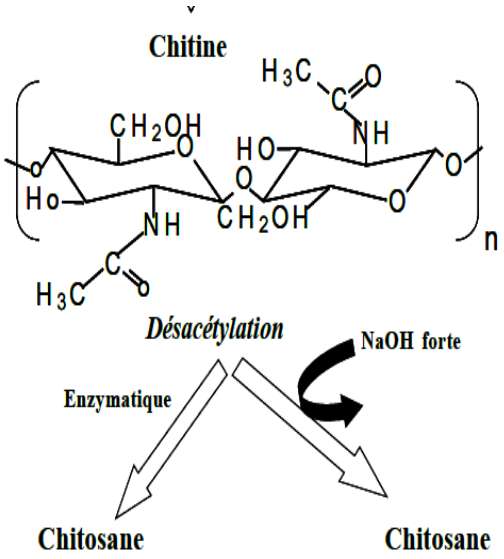


Fig. II. 2. Désacétylation du chitosane (Onsoyen et Skaugrud, 2007)

II. 2. 1. La désacétylation de la chitine

La désacétylation signifie l'hydrolyse des groupements acétyles présents dans la chitine pour avoir des groupes amines. D'habitude, la chitine est partiellement désacétylée par N-désacétylation alcaline (Haidra, 2018). La désacétylation est généralement effectuée par le traitement avec l'hydroxyde de sodium ou potassium concentré (Fig. II. 3). Il y a plusieurs facteurs essentiels qui affectent le rendement de désacétylation comme la température ; la durée de la réaction, la concentration d'alcalin, les traitements préalables pour l'obtention de la chitine, l'atmosphère (air ou azote) la quantité de chitine par rapport à la solution alcaline, densité de la chitine et la taille des particules. Compte tenu de tous ces paramètre, l'objectif idéal de désacétylation est de préparé un chitosane qui est non dégradé et parfaitement soluble dans l'acide dilué (acides acétique, lactique, citrique,…)

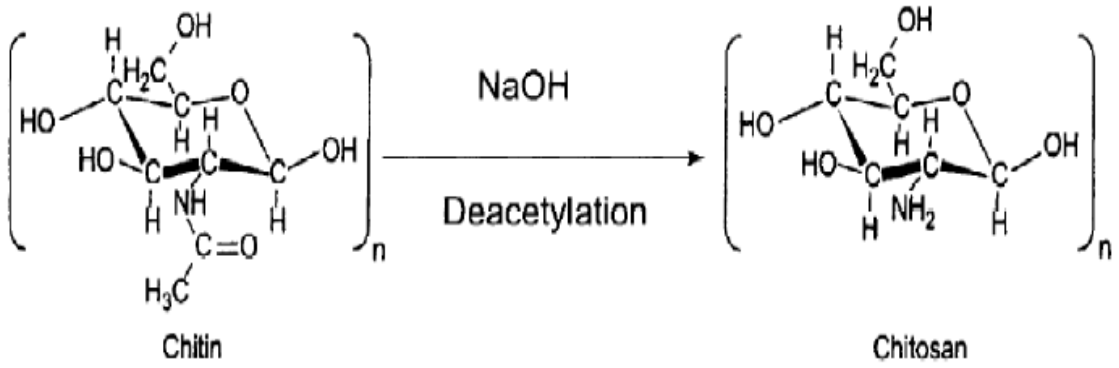


Fig. II.3. Conversion de la chitine en chitosane par désacétylation (Bensaha, 2010).

II. 3. Les enjeux de la valorisation des produits marins

La production mondiale de produits de la mer, estimée à 143 millions de tonnes (mt) en 2008, est en hausse. Cette augmentation est due à l'aquaculture ; les quantités pêchées sont quant à elles stables (environ 90 mt). Les problèmes de gestion des ressources halieutiques, illustrés par la baisse des quotas de pêche, obligent la filière à ne plus s'inscrire dans une logique de production de masse pour augmenter sa rentabilité. La durabilité et le respect de la biodiversité impliquent une optimisation de la production en recherchant une plus forte valeur ajoutée et en utilisant les captures dans leur intégralité. Dans ce contextes, une meilleure valorisation des coproduits devient un enjeu important pour la filière des produit aquatiques.

Les coproduits contiennent des protéines à haute valeur nutritive, des acides gras poly-insaturés (oméga3), des vitamines, des antioxydants, des minéraux, ainsi que des acides aminés essentiels et des peptides bénéfiques pour l'organisme… Autant d'atouts leur permettant d'être valorisés en une gamme de produits dérivés aux volumes de production et aux valeurs variés.

II. 3. 1. Valeur ajoutée des produits marins

Dans un contexte générale de valorisation des coproduits marins, l'extraction de la chitine n'est que l'une des voies exploitées. La majorité de coproduits marins est valorisée sous forme de farine et d'huile. Ils sont également convertis en hachis congelé et hydrolysats protéiques (Fig. II.4). Ces voies de transformation ne génèrent qu'une faible valeur ajoutée (Andrieux, 2004).

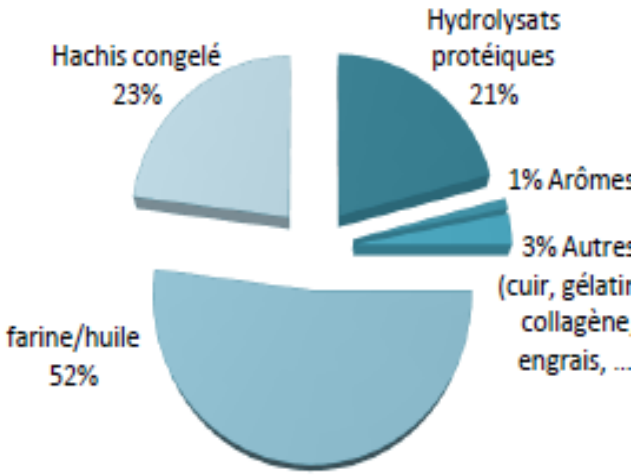


Fig. II. 4. Parts des voies de valorisation de coproduits marins (Andrieux, 2004).

II. 3. 1. 1. Les composées protéiques

Les protéines extraites des carapaces, peuvent être récupérées et valorisées ; si les conditions utilisées ne sont pas trop sévères. Une déprotéinisation à haute température dénature les protéines qui perdent leurs propriétés fonctionnelles. L'utilisation d'enzymes, comme l'alcalase pour déprotéiner de façon douce permet d'extraite un maximum de 90% des protéines, qui peuvent être valorisées sous forme d'hydrolysats (Synowiecki et al-Khateeb, 2000, Gildgerb et Stenberg, 2001). Ces protéines ont un bon indice en acides aminés essentiels (46%) et un coefficient d'efficacité protéique de 2.74 (Synowiecki et al-Khateeb, 2003). Elles peuvent être utilisées comme agent de remplissage et comme suppléments protéiques. L'hydrolysat peut être employé comme agent favorisant (Aye et Stevens, 2004).

II. 3. 1. 2. Les composées lipidiques

Les organismes marins sont capables de synthétiser des acides gras insaturés de la famille des 3 et 6, contrairement aux organismes terrestres. Cette capacité est liée à la température de leur milieu de vie. Les acides gras assurent l'élasticité des membranes à basse température. Ces acides gras sont également nécessaires aux organismes terrestres qui n'ont d'autre choix que l'apport alimentaire. À ce titre, les organismes marins constituent une source intéressante, avec une teneur en acides gras jusqu'à 40 %, permet lesquels l'EPA et le DHA (Bergé et Barnathan, 2005). Ces acide gras polyinsaturés sont conseillés pour réduire les risques de maladies liée au mauvais cholestérol et aurait des effets contre les inflammations, les ulcères et l'athérosclérose (Dumay, 2006).

II. 3. 1. 3. Les minéraux

Les coproduits de crevettes sont riches en éléments minéraux, particulièrement en calcium. Il existe sous forme cristalline, semi-cristalline ou amorphe, l'indice de cristallinité indique la proportion de zone cristalline.

Chapitre III : Les applications de la chitine et du chitosane

Le chitosane est un polymère d'origine biologique chargé positivement lorsqu'il est dissous dans un acide faible. C'est un avantage important pour ce polymère. Tous les autre biopolymères ont un caractère neutre ou anionique. Ce caractère cationique permet au chitosane en solution de réagir avec tous les composés biologiques chargés négativement (comme les lipides ou les protéines) et de les fixer solidement par des liaisons ioniques. C'est cette capacité à fixer les charges négatives qui détermine nombre d'effets du chitosane et notamment ses propriétés antibactériennes et sa capacité de liaison avec les lipides. Avec un contrôle rigoureux du poids moléculaire, du degré de désacétylation(DDA)et de la pureté, il est possible de produire une vaste gamme de chitosanes pour de multiples applications dans les domaines industriels, cosmétiques, diététiques ou biopharmaceutiques. De nombreuses études ont été menées sur les multiples usages du polymère(Goosen, 1997).Nous présentons ici les plus prometteuses.

III.1. Les applications

III. 1. 1. Dans le domaine de l'agriculture

Le chitosane et la chitine, en faible quantité (quelques mg par m^3 d'eau) sont capables de déclencher chez les plantes des mécanismes de défense contre les infections et les agressions parasitaire. Le mode d'action du chitosane est complexe et se situerait à plusieurs niveaux. Il renforce le système racinaire et l'épaississement de la tige, mais il est possible qu'il ait une action antifongique propre. Par ailleurs, le chitosane stimulerait la plante pour la synthèse d'agents protecteurs, et se comporterait comme un engrais en accélérant la germination et la croissance des plantes (Fry et al.,1993). L'enrobage des semences avec des chitosaneleur permet de résister aux attaques fongiques ; cette activité antifongique se manifeste également pendant la vie de la plante de façon directe ou par stimulation de certains processus de défense inhérents à la plante (Yamada et al., 1993 ; Lee et al., 1999).

III. 1. 2. Dans le domaine du traitement des eaux usées

Plusieurs études démontrent que le chitosane est un agent coagulant et floculant efficace dans le traitement des eaux usées industrielles.Des réductions de 70 à 98 %de la teneur en MES (matière en suspension, responsable de la turbidité) et de 55 à 80 % la demande chimique en oxygène (DCO) ont été observées pour le traitement des eaux usées en utilisant du chitosane comme floculant (Jun et al. 1994) en utilisant du chitosane comme floculant.

Du fait de leur forte densité de charge, les dérivés de chitine sont capables d'interagir avec les MES, les microorganismes et les ions métalliques (Taboada et al., 2003 ; Càrdenas et

al.,1876). Cettepropriété est utilisée pour piéger les composés dangereux, pour les éliminer ou les doser (Guibal et al., 1994 ; Camci-Unal et pohl, 2010 ; Skorik et al., 2010).Le chitosan est également employé pourrecycler les effluents de l'industrie textile en retenant des pigments (Yap et al., 2008).

Le chitosane peut être utilisé de plusieurs façons, la principale étant comme floculant (Crini, 2009). Les colloïdes en suspension, les métaux lourds, les colorants des eaux de teintureries(Hsein et Rorrer, 1995) ou encore les molécules aromatiques et phénoliques (No et Meyers, 2000 ; Krajewska, 2005) s'agglomèrent avec le chitosane et les flocs sont retenus par filtration. Les flocs de chitosan réduisent de 50% les MES (Rhee et al., 1998). Un autre mode d'action consiste à intégrer le chitosane directement dans la composition des membranes de filtration.

III. 1. 3. Les films/emballage du chitosane

Les films de chitine et de chitosan s'obtiennent par leur dissolution dans une solution acide. La teneur en humidité du polysaccharide doit être faible pour réussir le film.

Du point de vue de leurs caractéristiques mécaniques, les films de chitine ne peuvent pas subir d'élongation. Ceux à base de chitosane peuvent être étirés deux fois seulement. Ces propriétés mécaniques peuvent être améliorées par modification du chitosane (par ramification) ou par des ajustements de formulation. Par exemple, le chitosane-poly (vinyl-alcool) présente une meilleure résistance mécaniques, stabilité et capacité d'élongation(Nakano, 2007).

III. 1. 4. Dans le domaine médical

De par sa biocompatibilité avec les tissus du corps humain, le chitosane a démontré son efficacité pour toute forme de pansements (Fig. III. 1) : peau artificielle, pansements cornéens, fil de suture… en chirurgie dentaire, le chitosane est utilisé dans les implants ou dans la cicatrisation des gencives. (Kim et al., 2007),ont montré l'application du chitosane et de ses dérivés dans les organes artificiels comme le foie, les nerfs les os, lapeau, les cartilages, les vaisseaux sanguins, …etc.

En outre, c'est un bon support pour le transport et le relargage lent de principes actifs médicamenteux pour des applications à la santé humaine et animale (Chen et al., 2007 ; Senel et McClure, 2004). Ces auteurs ont montré des applications potentielles du chitosane dans la médicine vétérinaire.

Dans l'organisme, le chitosane n'étant pas hydrolysé par les enzymes digestives humaines, possède une charge ionique positive, il peut se lier facilement aux molécules chargées négativement comme les lipides, les graisses et les biliaires.



Fig. III. 1. Application du chitosane dans le domaine biomédical.

Ils forment une masse qui ne peut pas être absorbée par l'estomac ; celles-ci sont éliminées par voies naturelles. De cette façon le chitosane permet de diminuer le taux de cholestérols devenu le numéro un des produits amincissants naturels. En plus, le chitosane se comporte comme antimicrobien, antiviral, anticancer,…etc. (Allanet al., 1984 ; Sano et al., 1991).

Le chitosane, utilisé jusqu'alors pour la fabrication de nombreuses formes pharmaceutiques (comprimés, injectables,formes nasales…), a été choisi comme véhicule pour la mise au point d'hydrogels ophtalmiques (Felt, 1999 ; Morfin et al., 2002).

En chirurgie dentaire, le chitosane intègre des pansements appliqués sur des lésions dues aux infections de la dent. Il constitue un bio-matériel inoffensif, anti-inflammatoire et antimicrobien (Berthold et al.,1996).Des pâtes à mâcher à base de chitosaneet chito-oligosacharidesont également été étudiées, pour ôter les débris alimentaire ingérés. La salive libère les chito-oligomères, activant ainsi leur rôle anti-carie(Hayashi et al., 2007).

Le chitosane est utilisé par les vétérinaires comme moyen d'administration, tel que les sprays (application par douche), implant, bain, dispositif intra-mammaires, intra-rumen et intra utérin. Certains dérivés de la chitine sont indiqués pour favoriser la croissance et stimuler les défenses immunitaires (Kim, 2010 ; Senel et McClure, 2004).

A travers son pouvoir immunologique, le chitosanepeut stimuler les cellules impliquées dans la défense immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales et des agents photogènes.

Enfin, le chitosane est également montré actif contre la cryptosporidiose chez les chèvres et augmentent le grain 10g de poids des jeunes animaux(Ajout et al., 2015).

De plus, le chitosane possède une forte activité antimicrobienne dont le mécanisme exact est encore inconnu mais certains mécanismes ont été proposés. L'activité antibactérienne du chitosane serait due essentiellement à la charge positive qui interagit avec les phospholipides membranaire chargés négativement(Chen et al., 1996) ; ce qui crée une perturbation au niveau de la membrane avec une diminution des échanges de nutriments entre la bactérie et le milieu extérieur entrainant la mort cellulaire (Shahdi et al., 1999).

Par ailleurs, (Helander et al., 2001) ont prouvé que la clé de l'activité antimicrobienne du chitosane provient de la charge positive des groupements amine du chitosane $\mathbf{C}_2$ (structure poly-cationique à pH< 6.3). le même résultat a été montré par (Tsai et Su, 1999) pour lesquels le mécanisme d'action antimicrobienne de chitosane est dû aux interactions entre les cations du chitosane et les anions à la surface des bactéries qui modifient la perméabilité de la membrane cellulaire. De plus, le chitosane semblerait interférer et perturber la synthèse des ARN messagers en interaction avec l'ADN(Shahidi et al., 1999; Liu et al., 2009).

Grace à son rôle dans la réparation tissulaire de l'épiderme (Howling et al., 2001) et la cicatrisation (Lahiji et al., 2000), le chitosane est utilisé pour fabriquer des pansements et des bandages (Ribeiro, 2009). Par exemple, un mélange de chitosane et oxychitine est commercialisé comme agent de recouvrement pour les greffes. Le degré de désatylation augmentant, les performances de cicatrisation sont améliorée (Minagawa et al., 2007).

III. 1. 5. En cosmétique

La chitine est utilisée comme agent hydratant. Le chitosane forme à la surface de la peau un film protecteur et tenseur, capable de fixer d'autres principes actifs pour la peau. Il est aussi utilisé comme filtre solaire et rentre dans la composition de la pâte des dentifrices, crème de soins, shampooing,… de nombreux brevets ont été déposés dans ce domaine (Dutta et al., 2002).

III. 1. 6. Dans le domaine des matériaux

Pendant longtemps, le chitosane en tant que matériau a été utilisé comme matière plastique pour la production des films antimicrobiens destinés à l'industrie alimentaire, c'est-à-dire l'emballage protégeant des légumes frais, des fruits ou de la viande (Nadarajah et al., 2006). Plusieurs tentatives de production de nouveaux matériaux biofonctionnels ont également été

réalisées, tel que le greffage de dérivés esters de polyéthylene glycol (PEG) (Lebouc et al., 2005) ou phosphométhylation (Ruiz et al., 2000 ; Lebouc et al., 2009).

III. 1. 7. Dans domaine agro-alimentaire

Le chitosane et l'alginate de sodium sont parmi les nombreux biopolymères utilisés en tant que matériau d'encapsulation (Takeuchi et al., 1996). En milieu acide les groupes amine du chitosane sont protonés et leurs charges positives peuvent interagir avec des polyanions tels que l'alginate ou carraghénane pour former des complexes polyélectrolytesutilisés en encapsulation de divers composants bioactifs.

Le chitosane est aussi utilisé comme conservateur alimentaire, épaississant et stabilisant pour sauces, agent émulsifiant, film alimentaire et agent enrobant de fruits (protection antifongique et antibactérienne).

III. 1. 8. Dans le domaine du textile

Dans le domaine du textile, des principes actifs peuvent être encapsulés dans du chitosane et imprégnés dans les tissus pour fabriquer des vêtements dits « intelligents ». Les principes actifs se diffusent progressivement sur la peau à mesure que le vêtement est porté (No et Meyers, 2000). Le chitosane est également capable d'améliorer la force et la rigidité d'un tissu (Kim et al., 2007).

III. 1. 9. Autres applications

Le chitosane trouve également des applications dans d'autres domaines (Austin, 1984 ; Aibas,1991). Par exemple, en chimie, il est utilisé en tant que super absorbant (Shimahara et Takiguchi, 1988 ; Anthonsen et al., 1993). Phases stationnairepour lachromatographies (Rinaudo et al., 1999), capture (Kassai et al., 2000),ou encore support pour la catalyse (Raymond et al., 1993). Un autre domaine potentiel est celui des peintures, il permet également d'économiser les additifs chimiques. La figure III. 2,montre différentes formes de chitosane.

Enfin, la chitine, comme substrat nutritif, favorise la croissance de microorganismes chitono-lytiques. Cette propriété est exploitée pour améliorer des composts (Jin et al., 2005), et comme méthode d'identification de ces microorganismes (Gomez-Ramirez et al., 2004).

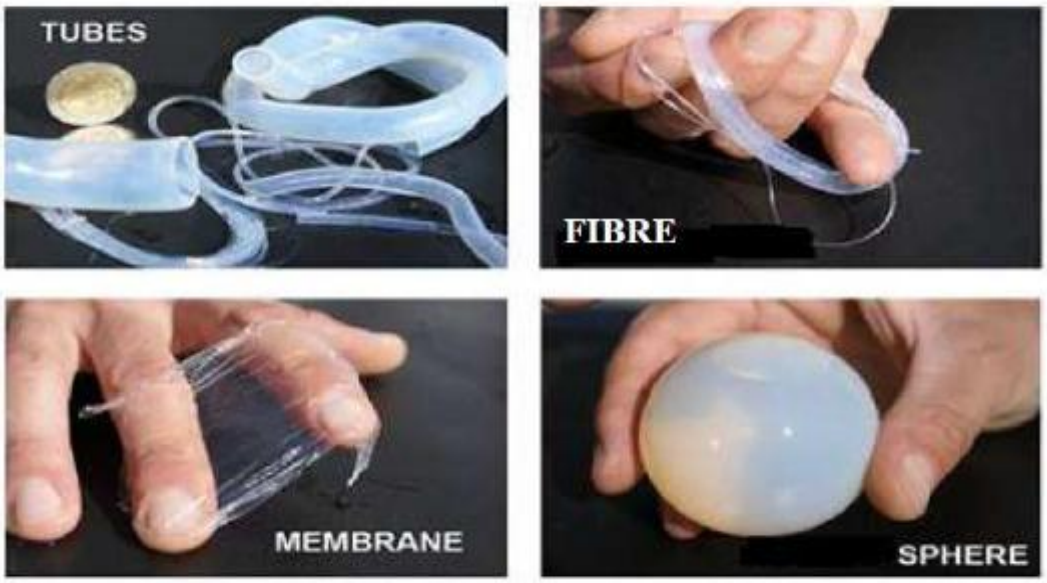


Fig. III. 2. Différentes formes de chitosane. (Ararem F., 2010).

III. 2. Evolution des volumes de vente par domaine d'application

La figure III.3, illustre, l'évolution des secteurs d'application du chitosane de 2001 à 2006.

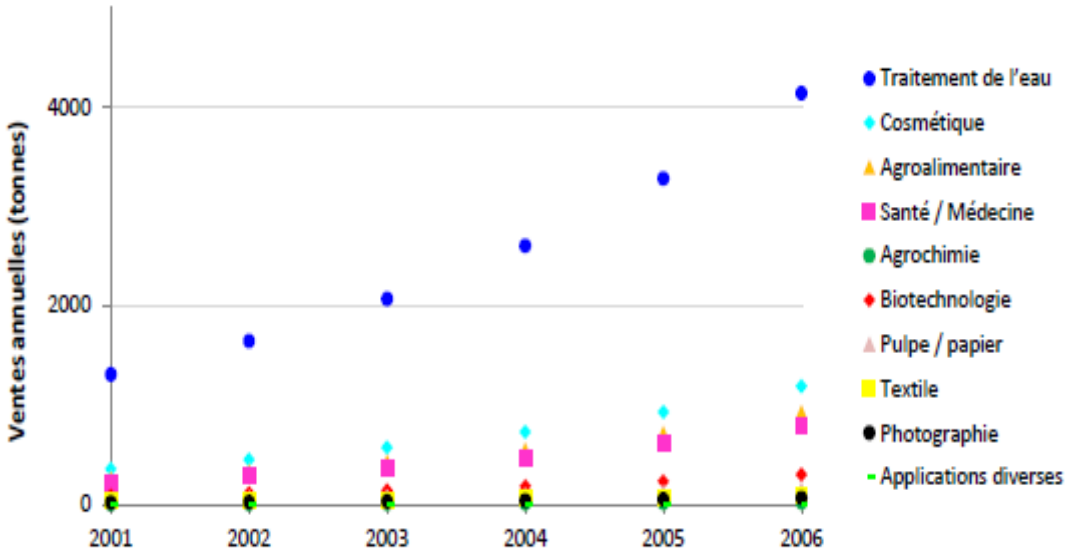


Fig. III. 3. Évolutions de la vente dans les différents domaines d'application du chitosan d'après (GIA, 2010).

Les applications du chitosane sont largement dominées par le secteur du traitement de l'eau, qui atteint plus de 4000 tonnes consommées en 2006. Ce secteur est suivi par celui de la cosmétique, de l'agroalimentaire, du médical et de l'agrochimie. Les autres secteurs tels que la biotechnologie, la papèterie, le textile et la photographie représentent de faibles volumes de ventes.

Le premier pays consommateur de chitosane, notamment pour le secteur du traitement de l'eau est le japon, avec près de 3700tonnes en 2006. Les pays occidentalisés, tels que les États-Unis, consomment davantage le chitosane dans les domaines de la cosmétique, de l'agroalimentaire,du médical et la biotechnologie. La zone Asie-Pacifique est leader dans la consommation du chitosan en agriculture/agrochimie(Tableau III.1).

Tableau III.1. Répartition de l'utilisation du chitosane par pays et par domaine d'application, en tonnes, en 2006 (GIA.2010)

Domaine d'application	USA	Europe	Japon	Asie-Pacifique	Canada	Autres	Total
Traitement de l'eau	450.3	368.6	2900.8	245.8	74.9	101.0	**4141.4**
Cosmétique	535.8	173.6	209.6	136.4	54.2	79.8	**118934**
Agroalimentaire	352.0	209.6	197.2	72.2	67.8	33.1	**931.9**
Santé/Médecine	306.5	84.9	156.2	200.5	31.1	13.9	**793.1**
Agrochimie	125.6	73.4	89.0	285.5	29.2	20.0	**622.7**
Biotechnologie	131.2	37.1	57.5	45.2	15.8	12.1	**298.9**
Pulpe /papier	39.1	28.9	36.1	29.6	11.2	6.8	**151.7**
Textile	23.47	17.8	25.5	19.9	6.3	4.3	**97.3**
Photographie	13.04	9.1	29.7	8.9	2.9	1.7	**65.3**
Applications diverses	28.89	18.9	54.1	19.1	8.3	4.1	**133.4**
TOTAL	**2005.9**	**1021.9**	**3755.7**	**1063.1**	**301.7**	**276.8**	**8425.1**

Chapitre IV : Matérieles et Méthodes

L'objectif de notre travail est d'extraire la chitine des crevettes par fermentation à l'aide des bactéries lactiques et de sources de carbone peu coûteuses peuvent remplacer le glucose, c'est la première étape de l'activation bactérienne pour caractériser les crevettes et améliorer les critères d'extraction de la chitine en utilisant le glucose dans la seconde étape, on a utilisé le jus de dattes comme source naturelle de carbone pour notre fermentation.

IV. 1. Matériel

IV. 1.1. Verrerie, appareils et produits chimiques

Les verreries, les appareils ainsi que les produits chimiques utilisés dans notre travail sont présentées dans le tableau (annexe1).

IV. 1. 2. Matériel biologique

- **La souche bactérienne**

Les bactéries utilisée, dans ce travail, est *lactobacillusdelbrucki* isolée par Boudhiaf et Kouider Ammar (2017) à partir de lait de vache de la région de Berouaghia. Cette souche était conservée dans des tubes contenant le milieu MRS (Man, Rogosa, et Sharpe, 1960) incliné et placée à 4°C.

- **Les dattes**

Dans notre travail, nous avons choisi la datte cuite pour : sa disponibilité et sa faible valeur marchande. La datte cuite communément appelé « el ghars » de fabrication algérienne, cette patte de datte a la même caractéristique que les autres variétés.

- **L'ail**
- **L'oignon**
- **Déchets de crevettes**

Ce sont les carapaces, y compris têtes et thorax, provenant des crevettes récupérés au niveau des poissonneries d'Alger.

- **Les bactéries pathogènes**

  Des bactéries pathogènes Gram positive et Gram négative ont été utilisés pour étudier l'activité antimicrobienne du chitosane, le jus de l'ail, le jus d'oignon ainsi que le mélange chitosane- jus d'ail, chitosane- jus d'oignon. Il s'agit des bactéries suivantes : *Staphylococcus aureus*(Gram positif), *Citrobacterdiversus*(Gram négatif) *Klebsiellapneumoniae*(Gram négatif) *Enterobactercloacae*(Gram négatif) *Klebsiellaoxytoca*(Gram négatif),*E. coli* (Gram négatif), *Proteus mirabilis* (Gram

négatif),Streptocoque hémolytic (Gram positif). Ces bactéries ont été isolées à partir des urines au niveau du Laboratoire de l'établissement public et de la santé de quartier.

IV. 1. 3. Les milieux utilisés

- **MRS liquide**

Le milieu de culture utilisée pour la réactivation de la souche et la préparation des précultures lors de la réalisation de cette étude est le milieu MRS dont la composition est présentée dans l'annexe 1.

- **Jus de datte**

Le jus de dattes a servis comme milieu de fermentation bon marché pour l'extraction biologique de la chitine. Des études antérieures ont montré l'efficacité de jus de dattes dans ce bioprocédé.

IV.2. Méthodes

IV. 2. 1. Procédures expérimentales

IV.2.1. 1. Réactivation de la souche

La souche de *Lactobacillus delbruckii*conservée à 4°C, a été réactivée en la cultivant dans du MRS liquide et incubée à 42°C dans des sacs d'anaérobiose pendant 24h.

Après incubation une coloration simple au bleu de méthylène a été réalisée afin de vérifier la forme de la bactérie. Pour se faire, on a procède de la façon suivante :

* Préparez un frottis bactérien ;

* Fixez la préparation à la flamme ;

* Inondez le frottis préparé avec une solution de bleu de méthylène pendant une minute ;

* Lavez la lame à l'eau et séchez sur papier filtre ;

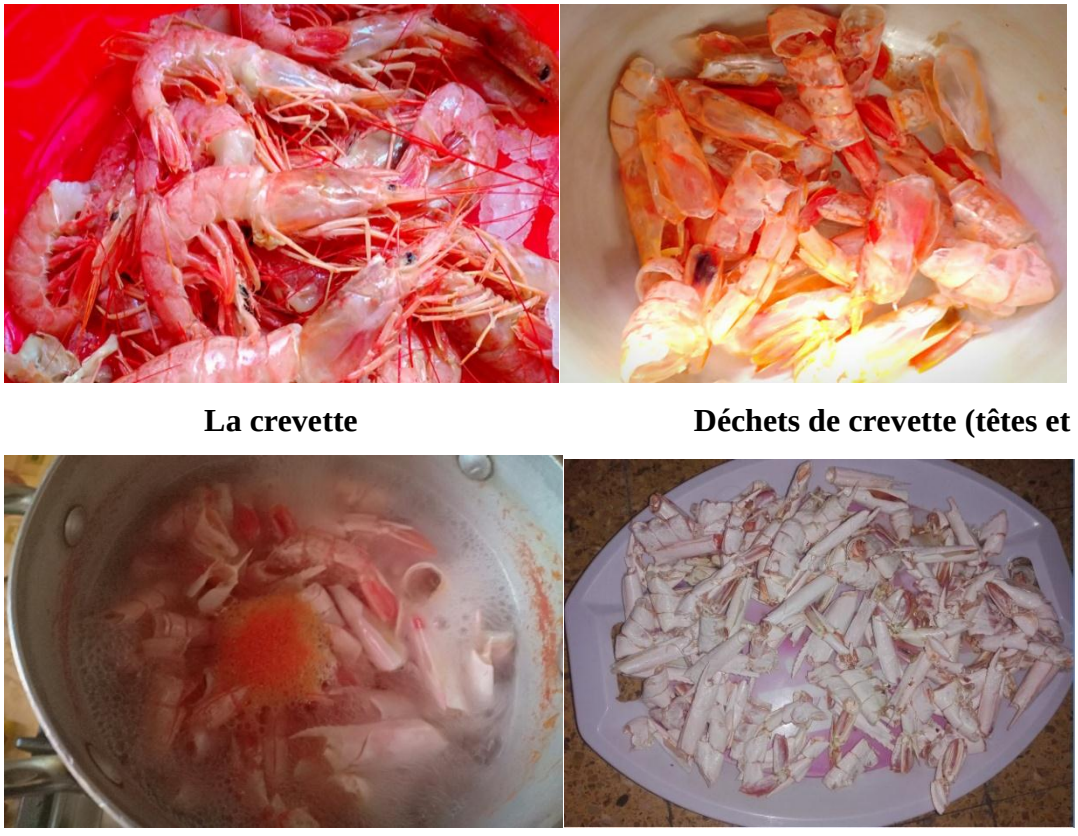
*Observez au microscope optique en faisant la mise au point avec le plus faible grossissement, ensuite passez au plus fort grossissement (X100).

IV. 2. 1. 2. Préparation du jus de dattes

Les dattes sont, soigneusement, lavées et dénoyautées. L'eau est additionnée à raison de 2 litres/Kg de pulpes. Le mélange est chauffé à 80°C pendant 2h. L'extrait est filtré à travers un tissu de mousseline afin de séparer les débris cellulosiques. Le filtrat, recueilli puis utilisé comme source de carbone et d'énergie pour la croissance bactérienne (Boudjelal et Nancib, 2001).

IV. 2. 1. 3. Préparation de la poudre de carapace

Avant leur utilisation, les carapaces des crevettes sont débarrassées de la chair, des antennes et des pattes. Les carapaces, sont ensuite bouillies dans de l'eau, pendant 1h, et ce pour enlever le maximum de tissus. Puis, elles sont séchées dans l'étuve à 163°C pendant 1h (Mukherjee, 2001), on laisse ensuite, refroidir. Après séchage, les carapaces sont débarrassées d'éventuels tissus encore présents, par frottement. En dernier, les carapaces sont broyées à l'aide d'un broyeur pour obtenir une poudre (Fig. IV. 1).



La crevette **Déchets de crevette (têtes et thorax)**

Les déchets de crevette sont bouillis **Les déchets filtrés et séchés**

Fig. IV. 1. Les étapes de préparation de la poudre de carapace de crevette

IV. 2. 1. 4. La fermentation

Des cultures en batch ont été réalisées dans des erlenmeyers de 250- 1000 ml, avec un volume utile de 100- 500 ml selon le protocole cité par Arbia et al. (2013) et sous agitation douce dans un incubateur agité. Les conditions optimalessont citées dans le tableau IV. 1.

Tableau IV. 1. Les conditions optimales de l'extraction biologique de la chitine (Arbia et al., 2015)

Facteurs	Valeurs
Concentration en sucres réducteurs	**195 g/l**
Température d'incubation	**25°C**
Quantité de la poudre de carapace	**8,2g**
Volume du milieu de culture	**257ml**
Volume de *Lb. delbruckii*	**25ml**
Tween 80	**1ml**
Temps de fermentation	**5jours**
NH_4Cl	**2,75g**
$CaCl_2$	**0,45g**

IV. 2.1. 5. Production du chitosane

-Après la récupération de la chitine on procède à une désacétylation par NaOH 40% pendant 15jours a température 35°C à raison de 0,5 :50 (w/v), pour l'obtention du chitosane ;

- Un lavage avec l'eau jusqu'à la neutralité (pH7) est effectué ;

- en fin, on fait un séchage à 20°C.

IV. 2. 1. 6. Préparation des jus d'ail et d'oignon

Les parties utilisées des plantes sont les bulbes d'ail et d'oignon. Le jus a été préparé en utilisant un extracteur de jus de cuisine sans l'utilisation de solvant (eau ou autre).

IV. 2. 2. Méthodes analytiques

IV. 2. 2. 1. Caractérisation de la chitine et du chitosane

- **Test de solubilité**

Le premier test de confirmation de la réussite de la désacétylation est le test de solubilité. Il est réalisé en faisant dissoudre 1mg du chitosane dans 100 ml d'une solution d'acide acétique à 1%.

- **Détermination du degré d'acétylation (DA) et de désacétylation(DD)**

La méthode la plus simple qui nous permet de déterminer le degré de désacétylation et le degré d'acétylation est la spectroscopie infrarouge. Les spectres infrarouge ont été obtenus en effectuant un balayage de 400à 4000 cm^{-1} de chitosane (chit D15-T35) ou de la chitine

dans des pastilles de KBr (1mg chitosane ou /100 mg KBr).Avant de prendre le spectre, chaque échantillon a été étuvé à 50°C pendant 24 heures.

Leurs valeurs sont déterminées en appliquant les formules suivantes :

$DA\% = (A_{1655}cm^{-1}/A_{3450}cm^{-1})*100/1.33$……**(éq. 1)**

Ou

$DD\% = \%NH_2 = [1-(A_{1655}/A_{3450}) *1/1.33]*100$

- $A_{1655}cm^{-1}$ est l'absorbance à la longueur d'onde 1655 cm^{-1} (Amide I 1655 cm^{-1}) ;
- $A_{3450}\ cm^{-1}$ est l'absorbance à la longueur d'onde 3450 cm^{-1} (Hydroxyle 3450 cm^{-1}).

Le facteur 1.33 représente le rapport (A1655/A3450) pour un chitosane entièrement N-acétylé.

- **Détermination de la viscosité et du poids moléculaire du chitosane**

Le poids moléculaire du chitosane est calculé à partir de sa viscosité intrinsèque notée [ɳ] en appliquant l'équation de Marque- Houwink (Kasaai, 2007) :

$[\eta] = KM^a$……**(éq. 2)**

K (4.75 10^{-5}dl/g) et a (0.72) : sont des constantes

M : poids moléculaire (daltons)

La viscosité intrinsèque du chitosane est déterminée expérimentalement par viscosimétrie capillaire en utilisant un tube à Vessie (figure IV. 2).

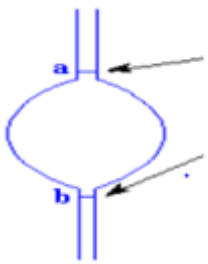


Fig. IV. 2. Schéma illustrant la détermination de la viscosité intrinsèque en utilisant un tube à vessie

La méthode est basée sur la mesure du temps d'écoulement d'un même volume de solvant (constitué d'acide acétique à 1%) oude solution de chitosane contenu entre les deux points (a) et (b) à l'aide d'un chronomètre.

Nous définissons la viscosité spécifique comme suit :

$$\eta sp = \frac{t - t0}{t0} \quad \textbf{(éq. 3)}$$

t : le temps d'écoulement de la solution de chitosane de concentration C_i

t_0 : le temps d'écoulement du solvant

En divisant cette valeur par la concentration de la solution de chitosane (g/dL), on obtient ce que nous appelons la viscosité réduit :

$$\eta red = \frac{\eta sp}{Ci} \quad \textbf{(éq. 4)}$$

Ainsi, pour différentes concentrations de chitosane (0,01 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,075 et 0,1g/dL), on obtient donc différentes valeurs de viscosités réduites. Le tracé des viscosités réduites en fonction des concentrations, donne lieu à une droite dont l'ordonnée à l'origine est égaleà la viscosité intrinsèque.

IV. 2. 2. 2. Analyse spectroscopique infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est utilisée pour caractériser lesgroupements fonctionnels présents à la surface des échantillons (carapace brute et fermentée).Les spectres FTIR ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker dans la région spectrale située entre 4000-500cm^{-1} avec unerésolution de 2cm^{-1}. Les échantillons ont été broyés, mélangés avec du KBr en poudre etensuite comprimés pour former des pastilles transparentes.

IV. 3. Etude de l'activité antibactérienne

Il s'agit de chercher l'activité antimicrobienne de certaines substances naturelles à savoir :

- Le chitosane préparé (2%);
- Le mélange : chitosane (2%)-jus d'ail ;
- Le mélange chitosane (2%)-jus d'oignon ;
- Le jus d'ail ;
- Le jus d'oignon.

Pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne (Fig. IV. 2) de ces molécules, 9 souches pathogènes isolées à partir des urines des malades au niveau de la direction de santé publique, Médéa.

Protocole

- Une suspension bactérienne de DO (0.08- 0.1) de chaque bactérie a été préparée ;
- Chaque suspension est ensemencée par écouvillonnage sur Muller- Hinton ;

- Des disques de papier filtre de 9mm de diamètre, préalablement stérilisés, sont trempés dans chaque solution et déposés à la surface des boites de Pétri ensemencée ;
- Laissez diffuser pendant 15- 20mn à température ambiante ;
- Incubez les boites à 37°C pendant 18- 24h ;
- Mesurez le diamètre des zones d'inhibition.

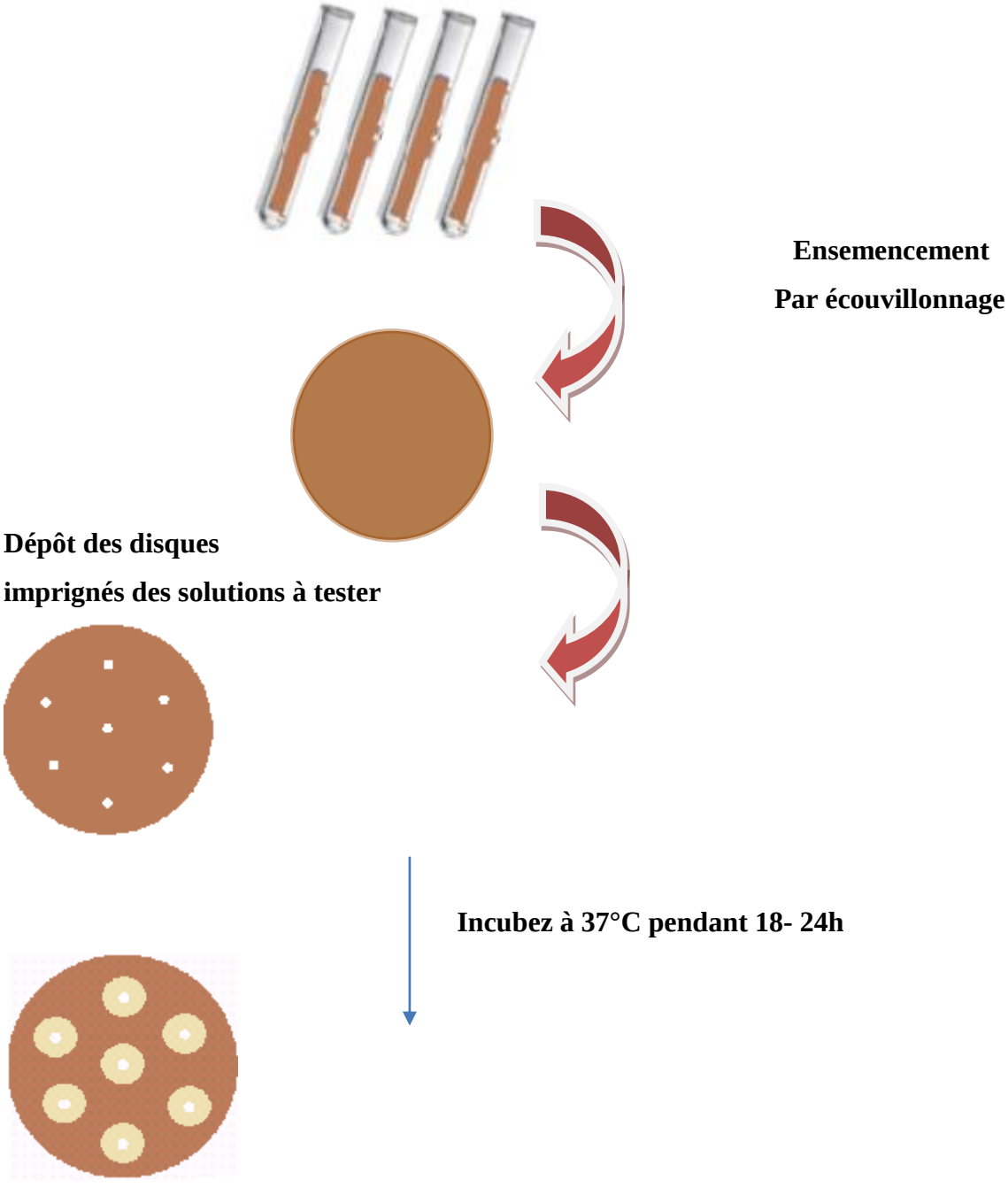


Fig. IV. 2. Recherche de l'activité antimicrobienne des substances étudiées.

Chapitre V
Résultats et Discussions

La récupération de la chitine par voie fermentaire a nécessité plusieurs étapes de revivification de la souche bactérienne, préparation de la carapace de crevette, préparation de jus de dattes et la réalisation des fermentations lactiques. Après la récupération de la chitine, une réaction de désacétylation, a été réalisée dans le but de préparer le chitosane. Les résultats obtenus sont présentés dans ce chapitre.

VI. 1. Réactivation de la souche

Lors de cette étude nous avons vérifié l'homogénéisation de la souche conservée, initialement isolées à partir du lait de vache. Après ensemencement sur milieu MRS solide, l'observation des colonies obtenues a révélé un aspect presque semblable: elles sont lisses, légèrement bombées, régulières, translucides ou opaques, de taille plus ou moins importante (2 à 3mm) et de couleur généralement blanche ou crème. La coloration au bleu de méthylène nous a permis d'observer des cellules en forme de courts bâtonnets (Fig. V. 1).

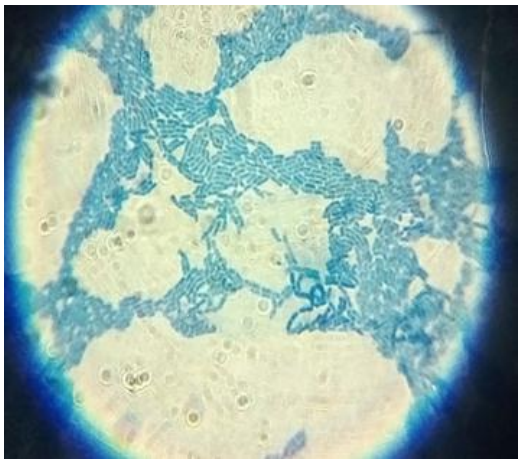


Fig. V. 1. Observation microscopique de la bactérie lactique réactivée (X100)

Ces caractéristiques correspondent à celle des bactéries lactiques.

V. 2. Récupération de la chitine et production du chitosane

V. 2. 1. Pour la chitine

La figure V. 2, présente la chitine récupérée par fermentation lactique à partir de la biomasse marine sèche constituée de déchets de crevettes.



Fig. V. 2. La chitine

VI. 2. 2. Production du chitosane (désacétylation de la chitine)

La préparation du chitosane par désacétylation douce de la chitine en utilisant du NaOH à 40%, sous une faible agitation, pendant 15 jours à une température de 35°C.

IV. 2. 3. Les quantités et les rendements de la biomasse, chitine et chitosane

Les quantités et les rendements de la chitine et du chitosane obtenu sont présentés dans le tableau V. 1.

Tableau V. 1. Les quantités et les rendements de la biomasse, chitine et chitosane

Quantité de carapaces (g)	213
Quantité de chitine (g)	95
Rendement de chitine (%)	44.6
Quantité du chitosane (g)	22.5
Rendement de chitosane (%)	25

Le tableau V. 1, montre que la quantité (g) de la chitine récupérée est de 44,6% de la biomasse sèche brute. Tandis que, la quantité du chitosane récupéré est de 25% par rapport à la biomasse sèche brute.

V. 3. Caractérisation de la chitine et le chitosane produits

V. 3. 1. Test de solubilité

Le premier test réalisé pour pouvoir déterminer les polymères qui peuvent être des chitosanes est le test de solubilité qui consiste à faire dissoudre 0,1g de la poudre traitée dans 100ml d'acide acétique à 1% (Roberts et Domszy, 1982).

Tableau V. 2. Solubilité du chitosane

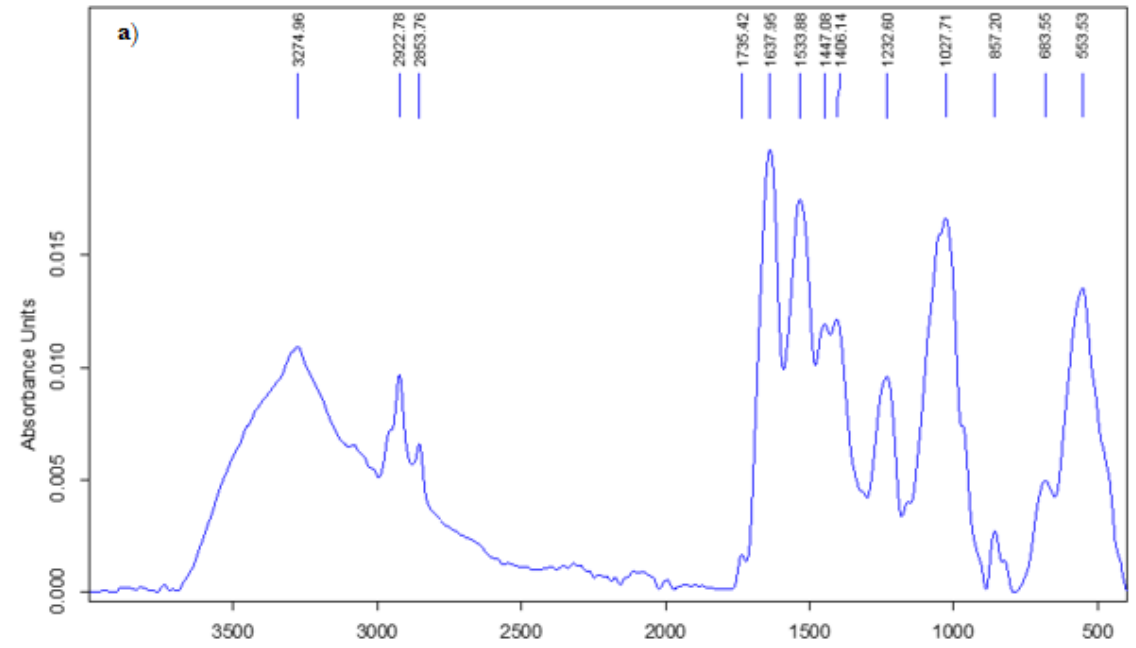
Masse initiale du chitosane	0.1g
Masse restante du chitosane après solubilité	0.065g

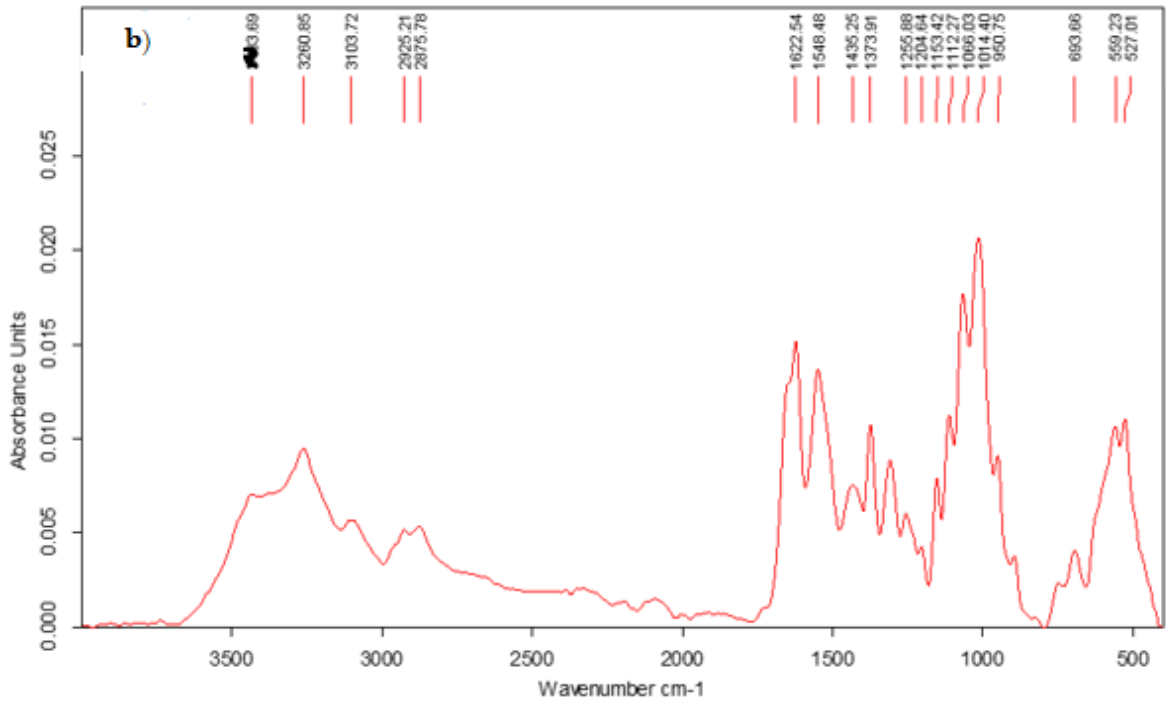
Le résultat a montré qu'il n y a pas eu solubilisation complète du chitosane, à cause des impuretés qui n'ont pas été éliminées lors de sa préparation.

V. 3. 2. Analyse des spectres IR de la chitine et du chitosane

Les spectres Infrarouge de la carapace brute, de la chitine purifiée et de la chitine commerciale sont présentés dans la figure V. 3. Le spectre de la carapace brute (figure V. 3) a montré la présence des pics caractéristiques de la calcite situés à 857.20 cm^{-1}, 1447.08cm^{-1} et quelques pics de l'α-chitine à 1637.95 cm^{-1}, 1027.71 cm^{-1} et553.53 cm^{-1} (Mikkelsen et al., 1997; Zhou et al., 2005 ; Griffiths et Haseths, 2007 ; Mario etal., 2007; Stawski et al., 2008).

La figure V.4ba montré la disparition des pics caractéristiques de la calcite et l'apparition des bandes intenses à 1622.54 cm^{-1}et 1548.48 cm^{-1}. Ces deux derniers sont spécifiques des amides et correspondent aux vibrations d'élongation des groupements carbonyle, inclus dans les chitines (C=O amide, généralement, appelé amide I) et de NH (amide II), respectivement (Heredia et al., 2007). En outre, le spectre montre, d'une part, la disparition du signal à 1533.88 cm^{-1}, qui correspond au pic d'absorption des protéines (Goodrich et Winter, 2007) et d'autre part, l'apparition de nouveaux pics à 950.75 cm^{-1}, 1066.03cm^{-1}, 1153.42 cm^{-1}, 1255.88 cm^{-1}, 1373.91 cm^{-1}, 1548.48 cm^{-1} et 3103.72 cm^{-1} correspondant à l'α-chitine identifiée chez la chitine commerciale.


a)
3274.96
2922.78
2853.76
1735.42
1637.95
1533.88
1447.08
1406.14
1232.60
1027.71
857.20
683.55
553.53
Absorbance Units
0.000
0.005
0.010
0.015
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500


b)
3260.85
3103.72
2925.21
2875.78
1622.54
1548.48
1435.25
1373.91
1255.88
1204.64
1153.42
1112.27
1066.03
1014.40
950.75
693.66
559.23
527.01
Absorbance Units
0.000
0.005
0.010
0.015
0.020
0.025
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Wavenumber cm-1

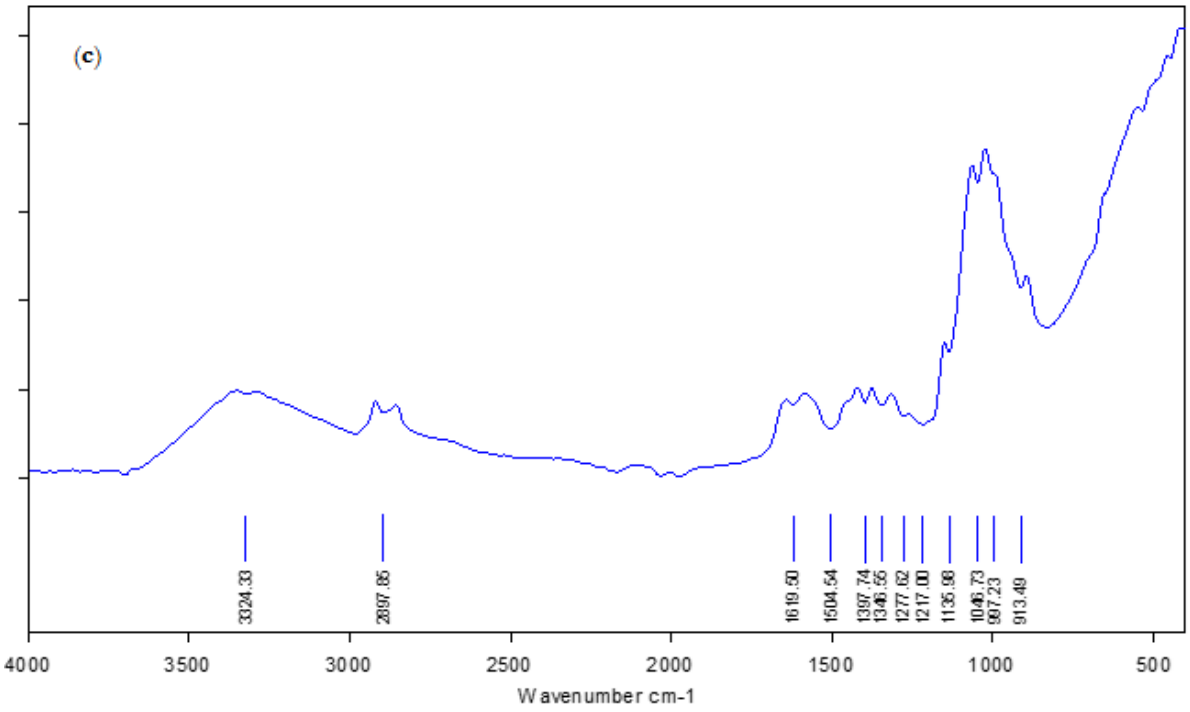


Fig. V. 3. Spectres Infra-rouge de (a) la carapace brute (b) la chitine (c) le chitosane

La figure V. 3c, montre que les intensités des pics à 3103.72cm^{-1} et 3260.85cm^{-1} caractérisant les liaisons d'hydrogène intermoléculaire $C_{(2)}NH$---$O=C_{(7)}$ et $C_{(6)}OH$---$HOC_{(6)}$respectivement sont bien apparus dans le spectre de la chitine par contre dans l'échantillon traité par la soude sont inexistants (Fig. V. 3c). On voit que le pic apparu à 2925.21cm^{-1} correspondant à $-CH_2$est bien apparu dans le spectre de la chitine mais qui est absent dans l'échantillon désacétylé. On voit aussi des pics de l'amine I et de l'amine II correspondant respectivement à 1622.54cm^{-1}et 1548.48cm^{-1}et la disparition de ce dernier dans l'échantillon désacétylé prouve bien qu'ils sont désacétylés.

V. 3. 3. Détermination du poids moléculaire et de la viscosité du chitosane

Le poids moléculaire du chitosane a été calculé à partir de la viscosité intrinsèque notée [η] en appliquant l'équation de Marque-Houwink (éq. 1) ou k et a sont des constantes et M le poids moléculaire (Daltons) (kasaai, 2007).

$[\eta]= kM^a$……(éq. 1)

En se référant à Rao (1993) qui a utilisé le même solvant à 30°C, nous avons adopté la valeur 0,72 pour a et 4,74.10^{-5}dL/g pour k.

L'évolution de la viscosité réduite ($\eta_{réd}$(dL/g)) en fonction de concentration de chitosane obtenu est présentée dans la figure V. 4.

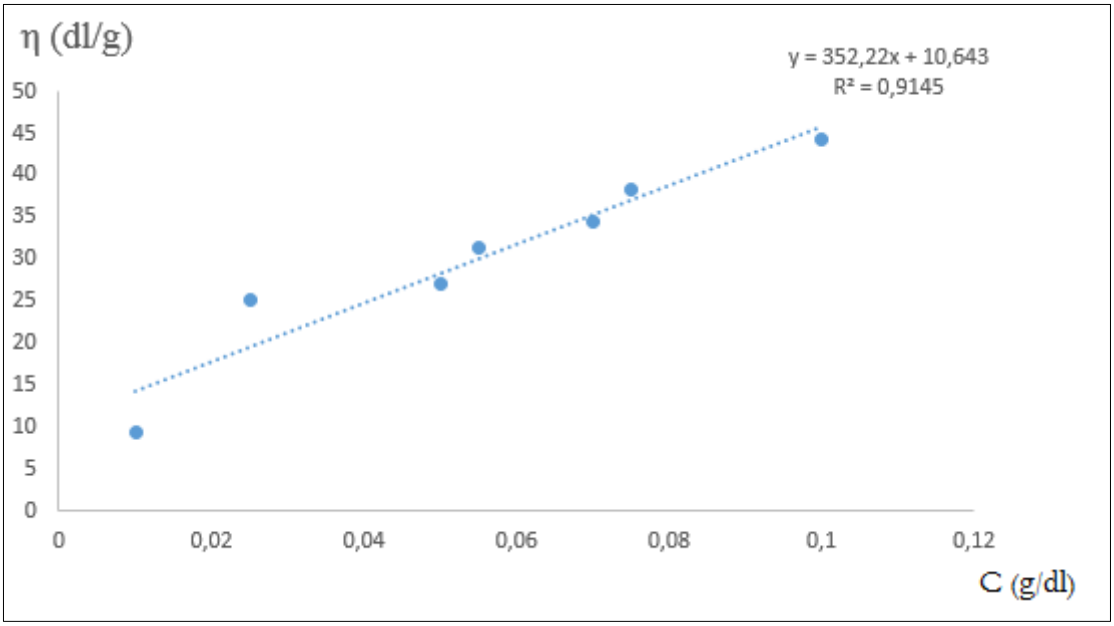


Fig. V. 4. Evolution de la viscosité réduite en fonction de la teneur en chitosane à 30°C.

L'ordonnée à l'origine de l'équation du graphique nous donne directement la valeur de la viscosité intrinsèque qui est de l'ordre de 10,643dL/g. En remplaçant la valeur de la viscosité intrinsèque dans l'équation (1) nous obtenons le poids moléculaire de notre échantillon qui est de l'ordre de 27MDa. La valeur de poids moléculaire (PM) d'un chitosane dépend intimement du procédé de préparation, car celui-ci peut induire une dépolymérisation des chaines macromoléculaire et/ou une dégradation lors de sa production (Kaddouche, 2013). Lechitosane est un polymère qui peut atteindre des poids moléculaires (PM) élevés, atteignant jusqu'à 1- 3 MDa dans le cas de produits extraits par des processus contrôlés d'extraction et de désacétylation (Crini et Badot, 2007). Ces poids déterminent l'application désirée pour le chitosane.Comparé à d'autres échantillons cités dans la littérature, cet échantillon a un poids moléculaire très élevé. Ce-ci est due probablement au procédé biologique de l'obtention de la chitine qui permet de préserver sa structure et ces caractéristiques ainsi qu'au traitement de désacétylation doux (température 35°C), car le paramètre température a une forte action sur le poids moléculaire du chitosane.

V. 4. L'activité antimicrobienne du chitosane

L'étude de l'activité antimicrobienne du chitosane seul ou en combinaison avec d'autres biomolécules naturelles (jus d'ail et jus d'oignon) nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans la figure V. 5.

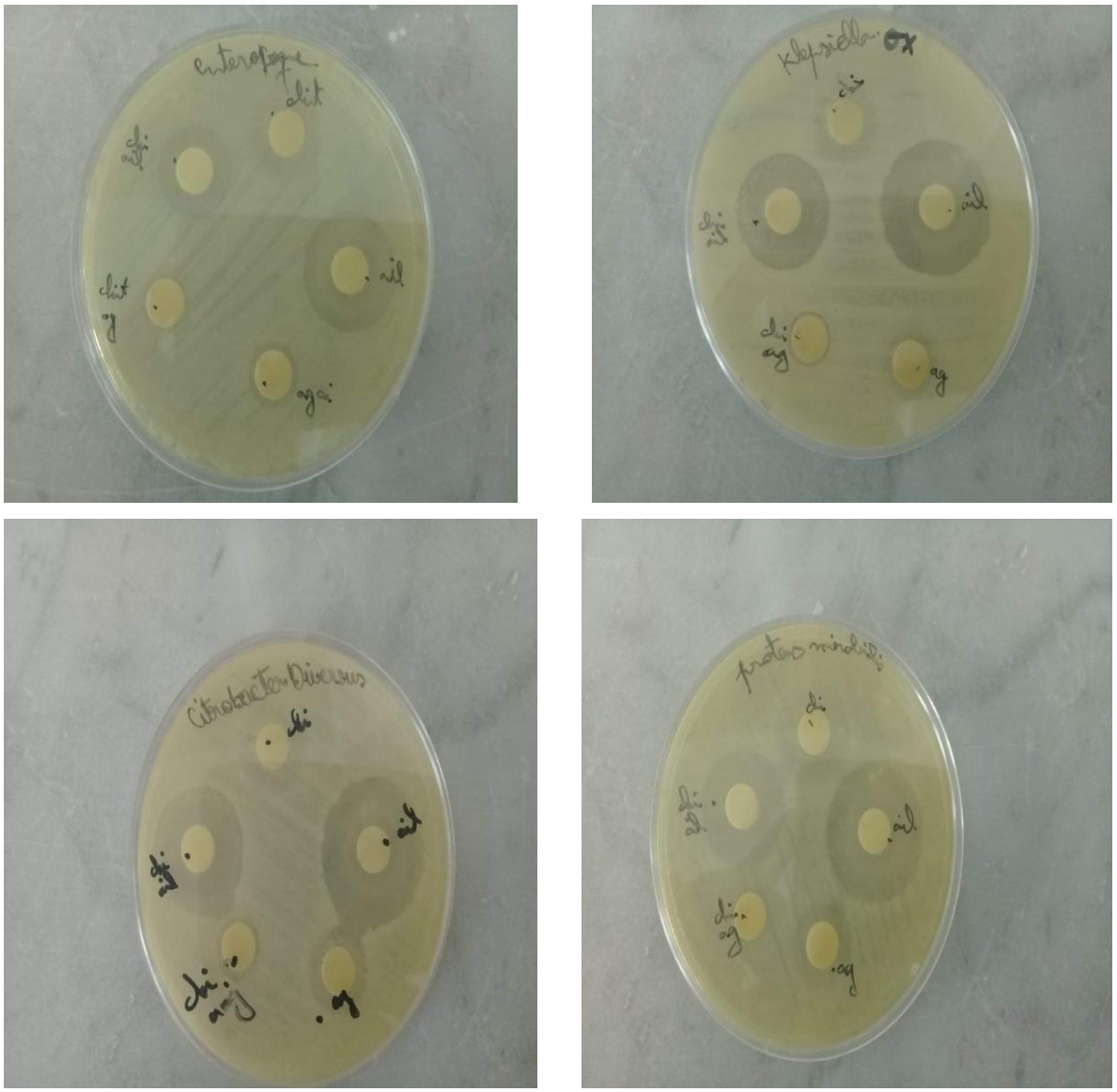


Fig. V. 5. L'effet de différentes biomolécules : chitosane, chitosane- jus d'ail et chitosane- jus d'oignon sur différentes souches pathogènes

Afin d'estimer l'efficacité des biomolécules étudiées, on a mesuré les diamètres des zones d'inhibition obtenues. Les résultats sont présentés dans la figure V. 6.

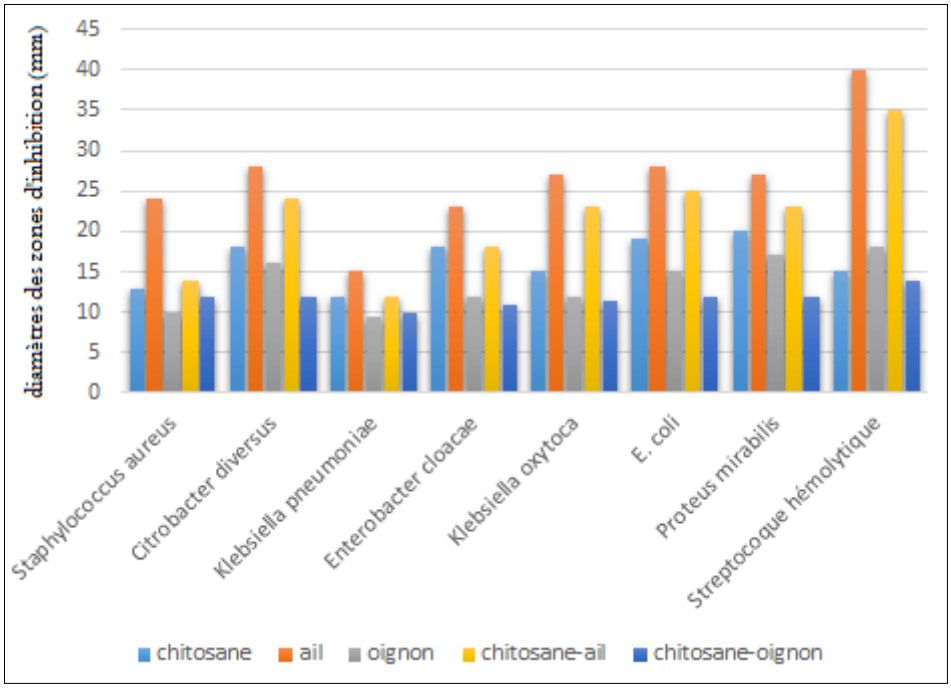


Fig. V. 6. Evolution des diamètres des zones d'inhibitions des biomolécules étudiées en fonction des souches pathogènes

La figure V. 6, montre que le jus d'ail a une importante activité antimicrobienne sur toutes les bactéries testées dont les diamètres des zones d'inhibition varient de 15- 40mm. Suivi par le chitosane qui présente une activité antimicrobienne moins importante que celle de jus d'ail, dont les diamètres des zones d'inhibition varient de 12 à 20mm. Une faible activité antimicrobienne a été obtenue avec le jus d'oignon qui a donné des zones d'inhibition variant de 10 à 18mm de diamètre. Cette activité a diminué encore en mélangeant le jus d'oignon avec le chitosane, avec des zones d'inhibition de 10- 14mm de diamètre ; ceci est expliqué par un effet antagoniste entre le chitosane et le jus d'oignon. Par contre l'association du chitosane- jus d'ail, a permis l'amélioration de l'activité antimicrobienne du chitosane dont les diamètres des zones d'inhibition sont de 14- 35mm. Ce-ci peut être expliqué par un effet synergique entre le chitosane et l'ail.

La figure montre également que streptocoque hémolytique est plus sensible à l'ail ou au mélange ail-chitosane par rapport aux autres bactéries testées.

Le résultat obtenu en utilisant l'ail *(Allium sativum)*, est majoritairement dues à la présence de l'allicine, le composé soufré responsable de l'odeur caractéristique de l'ail. L'allicine (thiosulfinate de diallyle) est produite suite au bris mécanique des cellules d'ail qui permet le contact entre l'alliine, un acide aminé non-protéique présent en grande quantité dans le cytoplasme et l'alliinase, une enzyme stockée dans les vacuoles qui occupe environ 10% du contenu total en protéine des gousses d'ail. Les disulfites de l'allicine réagissent très rapidement avec les groupements thiols libres sur les protéines. Beaucoup de réactions enzymatiques essentielles aux bactéries et aux champignons sont alors inhibées. Les enzymes potentiellement inhibés par l'allicine sont : succinate déshydrogénase, uréase, papaïne, xanthine oxidase, hexokinase, cholinestérase, glyoxylase, triose phosphate déshydrogénase, alcool déshydrogénase et cystéine protéase. Focke*et al*, 1990 (cité par Geneviève, 2007) ont aussi démontré l'inhibition spécifique de l'acétyl-CoA synthétase par une liaison non-covalente et réversible de l'allicine à cette enzyme. Chez les mammifères, c'est la présence de glutathion qui les protège contre les effets réactifs de l'allicine(Geneviève, 2007).

Cependant, l'ail en suspension dans l'eau, a le désavantage de s'oxyder rapidement et de perdre son efficacité antimicrobienne. Cependant, l'ajout de chitosane dans la solution d'ail semble augmenter la stabilité du bio-bactériocide en retardant le processus d'oxydation des composés phénoliques au contact de l'air. En outre, le chitosane possède aussi des propriétés filmogènes qui permettent la formation d'une matrice qui peut englober les molécules actives de l'ail permettant d'augmenter le temps de contact de ces moléculesce qui permet une action de protection contre les agents infectieux pendant une longue durée.

Conclusion Générale

L'objectif de notre travail est la récupération de la chitine à partir des déchets de crevette par voie fermentaire en utilisant le jus de dattes comme milieu de fermentation, ensuite la préparation du chitosane par une désacétylation douce.

La bactérie utilisée, était isolée à partir du lait de vache dans le cadre d'un projet de fin d'étude réalisé au niveau de l'université de Médéa. Cette souche a été réactivée et ensemencée pour préparer une préculture qui a servi à l'ensemencement du bioréacteur.

Après 5 jours de fermentation à 25°C, le rendement de la chitine obtenue est de 44.6% alors sa désacétylation nous permis d'obtenir le chitosane à un rendement de 25%.

La chitine et le chitosane obtenus ont été analysés par spectroscopie infrarouge et comparé avec le spectre infrarouge de la carapace brute. Cette analyse a montré la disparition des pics de calcite et des protéines et l'apparition des pics caractéristiques de la chitine. De même, l'analyse du spectre IR du chitosane a montré la disparition des pics caractéristiques de la chitine ce qui confirme sa désacétylation.

Le chitosane obtenu a une viscosité de 10.643dL/g. cette mesure nous a permis de calculer son poids moléculaire qui est de l'ordre de 27MDa.

L'étude de l'activité antimicrobienne du chitosane et/ou en combinaison avec d'autres biomolécules naturelles à savoir : le jus d'ail et le jus d'oignon. Les résultats ont montré que :

- Le jus d'ail a une importante activité antimicrobienne sur toutes les bactéries testées dont les diamètres des zones d'inhibition varient de 15- 40mm ;
- Suivi par le chitosane qui présente une activité antimicrobienne moins importante que celle de jus d'ail, dont les diamètres des zones d'inhibition varient de 12 à 20mm ;
- Une faible activité antimicrobienne a été obtenue avec le jus d'oignon qui a donné des zones d'inhibition variant de 10 à 18mm de diamètre ;
- Le mélange jus d'oignon-chitosane, avec des zones d'inhibition de 10- 14mm de diamètre ;
- Par contre l'association du chitosane- jus d'ail, a permis l'amélioration de l'activité antimicrobienne du chitosane dont les diamètres des zones d'inhibition sont de 14-35mm.
- Le résultat montre également que streptocoque hémolytique est plus sensible à l'ail ou au mélange ail-chitosane par rapport aux autres bactéries testées.

En perspective on propose :

- D'approfondir la caractérisation physique de la chitine et du chitosane obtenus ;
- faire une application dans l'industrie agro-alimentaire ou pharmaceutique.

Références bibliographies

-A-

- Arbia W., L. Adour, A. Amrane, H. Lounici, 2013. Optimization of medium composition for enhanced chitin extraction from by Lactobacillus helveticus using response surface methodology. Food Hydrocolloids 31 (2013)392-403.
- Arbia W. Etude de l'optimisation de la récupération de la chitine par fermentation de dechets marins 2014. Thèse de Doctorat, Ecole nationale Polytechnique, Alger.
- Aberg, M.C., Chen, T. &Pyane, F. G. (2002). Renewable ressources and enzymatic processes to create functional polymers : adapting materials and reactions from food processing. Journal of Polymers and the Environment,10,77-84.
- Adjou K, et al. ‘’ Maitrise de la cryptospordiose avec le chitosane : essai in vivo ». Proceedings : Journées nationales DTV – Nantes 2015, pp. 377- 380.
- Aibas. Int JBiolMacromol 13. 1991.40.
- Andrade, V.S., Neto, B.D.B., Fukushama, K. and Campos-Takaki, G. M. (2003) Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by Mucorcircinelloides (MucorJavanicus IFO4570)-Afactorial study. RevistaIberoamericana de Micologia, 20, 149-153.
- Andrieux G : La filiére française des coproduits de la pêche et de l'aquaculture. In :Rapport scientifique du projet Gestion Durable. OFIMER ; 2004.
- Ararem F., 2010. Synthèse et caractérisation de biopolymères. Application au Piégeage de colorants. Univ. Oran Es- Sénia.
- Aye, K. N., Stevens, W.F., Technical note improved chitin production by pretreatement of shrimp shells, Journal of chemical technologie and biotechnology, 2004, 79, 421-425.
- Aytekin O. and M. Elibol (2009) Cocultition of Lactococcuslactis and Teredinobacterturnirae for biological chitin extraction from prawn waste. Bioprocess Biosystem Engineering. DOI10.1007/s0049-0090-0337-6.
- Allan G C,.Peyron M, Moleculaire- Weight Manipylation of chitosane -1- kinetic of Depolymerization by Nitrous- Acid, carbohydr. Res. 277 (1995). 257-272.
- Acharya B. Vishu Kumar, Latitha R. Gowda and Rudrapatnam N. Tharanathan :Non-specific depolymerization of chitosane by pronase and characterization of the resultant products. Eur. J. Biochem. 271(2004)713-723.

- Amiali Malek. (1999) : Caractérisation des films de chitosane par la perméabilité à la vape d'eau et aux gaz (CO2, O2) thèse en sciences des aliments, université Laval(Canada).

-B-

- Bajaj M, winter J, GalletC : Effect of deproteination and deacetylayion conditions on viscosity of chitin and chitosan extracted from Crangoncrabgon shrimp waste. BiochemEng J, 2011, 56(1-2) : 51-62
- Bal Y., Bal K. E., Laarabi- Bouamrane O. and Lallam A., 2006. Copper (II) uptake by Pleurotusmutilus biomass, chitin and chitosan. Mineral Eng., 19 (14),1456- 1458.
- Bégin, M. Calsteren (1999) « Antimicrobial films produced fromchitosan », International journal of biological Macromolecules, 26, 63-67.
- Bergé JP, BarnathanG : Fatty acids from lipids of marine organisms : Molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. In : Marine Biotechnology I. Edited by Gal YL, Ulber R, vol.96. Berlin : Springer- Verlag Berlin ; 2005 :49-125
- Berthold A, Cremer K, KreuterJ : Preparation and characterization of chitosane microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for antiinflammatory drugs. Journal of Controlled Release, 1996, 39(1) : 17-25.
- B. k. Choi, K. Y. Kim, Y. J. Yoo, S. J. Oh, J. H. Choi, C. Y. Kim (2001) « In vitro antimicrobial activity of chitooligosaccharide mixture againstActinobacillusactionomycetemcomitans and streptococcus mutans », Intrrnational Journal of antimicrobial Agent, 18, 553-557.
- Blackwell J. Chitine in Biolymers. Walton AG, Blackwell J eds. New Yude, Academic press (1973) 474.
- Berth G, H.Dautzenberget M. G.Peter. Physico-chemical characterizatiochitosansvarrying in degree of acetylation . Carbohydrate polymers, 36. 1998. 205-218.

-C-

- Camci-Unal G, Pohl NLB : Thermodynamics of binding interactions between divalent copper and chitin fragments by isothermal titration calorimetry (ITC). CarbohydrPolym, 2010, 81(1) : 8-13

- Cid E., Gomis R.R., Geremia R.A., Guinovart J.J. et Ferrer J.C., (2000)- Identification of two essential glutamic acid residues in glycogen synthase. J BiolChem 275(43):33614-21.
- Chen S., Liu M., Jin S., Wang B. Inter. J. pharm., 349 (2007)180.
- Chen R. H. et Hwa H. (1996)- Effects of molecular weight of chitosane with the same degree of deaccetylation on the thermal, mechanical and permeability properties of theprepared membrane. Carbohyd. Polym., 29, 353-358.
- C. Qin, H. Li, Q. Xiao, Y. Liu, J. Zhu, Y. Du (2005) « Water solybility of chitosan and its antimicrobial activity of hydroxypropylchitosane », Carbohydrates Polymers, 63.367-374.
- Crini G, badot PM, Guibal E : Chitine et chitosane. Du polymère à l'application : presses universitaires de franche-Comté ; 2009.
- Chatelet, C., O. Domard. Influence of the degree of acetylation on some Biological properties of chitosan Films. Biomater., 22(2001)261-268.
- Coma V., Deschamps A, A. M. Gros (2003) « bioactive packaging materials from edible chitosan polymer antimicrobial activity assessment on dairy related contaminants », Journal of Food Science, 68(9)2788-2792.
- Crini G. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review.BioresourceTechnology. (97) 1061-1085, 2006.

-D-

- Djelad Amal, 2010. Préparation des matériaux composites chitosane-z
- De holand, H. D., and Netto, F. M. « Recovery of component from shrimp(*Xiphopenaeuskroyeri*) Processing woste by enzymatic hydrolysis. Journal of Food Science 71, 5 (2006) :298-303.
- De Jin R, Suh JW, Park RD, Kim YW, Krishanan HB, Kim KY (2005)- Effect of chitine compost and broth on biological control of Meloidogyne incognita on tomato (*Lycopersiconesculentum*Mill.). nematology, 2005, 7, 125-132.
- Dumay J : Extraction de lipides en voie aqueuses par bioréacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration : application à la valorisation de co-produits de poisson (Sardina pilchardus). Université de Nantes,2006, p325.
- Dutta P. K., Ravikummar M. N. V. et Dutta J. J. Macromol. Sci. Part C. Polym. Rev. 42, (2002).307.

- Devlieghere F, A. Vermeulen, J. Debevere (2004) « chitosan : antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables », Food Microbilogy, 21, 703-714
- Denuzière M., (1998)- Risques liés au colorant E122. Les colorants & leurs mystères.

-F-

- Fagbenro O. (1996) Preparation, properties and preservation of lactic acide fermented shrimp heads. Food Research International, 29, 595-599.
- Felt O., 1999. Evaluation d'un polysaccharide cationique comme véhicule pour la voie ophtalmique. Thèse de doctorat d'état. Université de Genéve.
- Fukamizo T, Ohkawa T, Ikeda Y, S. Biochim. Biophys. Acra. 1205 (1994) 83
- Fry S. C., Aldington, S., Hetherington, P. R. &aitken, J. (1993). Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. Plant Physio, 103, 1-5.

-G-

- Gallert, C., and Winter, J. ‘’Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. ‘’Applied microbiology and biotechnology 79.4 (2008) : 687-697.
- Gartner, C., Pelàez, C. A., and Lopez, B. L. ‘’ Characterization of chitin and chitosan extracted from shrimp shells by two methods ‘’ e-polymers 10.1 (2010) :1-16
- Gia, 2010. Chitine et chitosane. Un rapport de gestion stratégique globale. Global Industry Analysts ; MCP-2039 : 230.
- Gildberg, A., Stenberg, E., A new process for advanced utilisation of shrimp waste, Process Biochemistry, 2001, 36, 809-812.
- Gomer Ramirez M, Rojas Avelizapa LI, Rojas Avelizapa NG, Cruz Camarillo R. (2004). Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R, a useful substrate to select chitinolyticmigroorganisms and to evaluate chitinases. Journal of microbiological methodes, 2004, 56(2), 213-219.
- Geneviève richard.Dévoloppement d'un biofoongique à base d'ailet de chitosane pour luttercontre le blanc de la tomate de serre. Department de phytologiefaculté des sciences de l'acricultureet de l'alimentationuniversitélaval Québec 2007.
- Goosen, M. F. A. (1997). Applications of chitin and chitosaneTechnomicPuplishing Company Book, Lancaster.
- Guo B-L., et Gao Q-Y Carbohydr. Res., 342, (2002) 2416.

- Guillard C. Disdier J, Monnet C, Dussaud J, Malato S, Blanto J, Maldonadu MI.

-H-

- Herrman M, ApplCatal. B : Environ, 46, (2003), 319.
- Haidra F. 2018. Mémoire de master : Préparation chitosane à partir de crustacé locaux et son emploi dans la coagulation- Floculation de suspension de bentonite. UniversitéAbdElhamidIbnBadis-Mostraganem.
- Hayashi Y, Ohara N, Ganno T, Yamaguchi K, Ishizaki T, Sato M : Chewing chitosan-containing gum effectively inhibits the growth of cariogenic bacteria. Arch OralBiol, 2007, 52(3) :290-294.
- Helander I.M., Murmiho-Lassilla E.L., Ahvenainen R., Rhoades J., et Roller S., 2001.- chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Int. J. Food Microb., 71, 235-244. (2001).
- Howling GI, Dettamar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ : The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skhinfibrobalasts and keratinocytes in vitro. Biomaterials, 2001,22(22) :2959-2956.
- Hsein TY, RorrerGL : Effects of acylation and cross-linkingon the material propertiesand cadmium ion adsorption capacity of porous chitosan beads. Sep SciTechnol, 1995, 30(12) :2455-2475.
- Helander I.M,.Lassila E.L,.Ahvenainen R,. Rhoades,. Roller S (2001) « chitosanedistrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram negative bacteria », Internatinal Journal of Food Microbiology, 71, 235-244.
- Hudson SM., DW. Jenkins. Chitin and chitosan in : EPST. Mark HF; ed. New York: Wiley .2003.569.

-J-

- Jo G.H., W.J. Jung, J.H. Kuk, K.T. Oh, Y.J. Kim, R.D. Park (2008) Screening of protease producing Serratiamarcescens FS-3. Carbohydrate Polymer, 68, 746-750.
- Jo G. H., R.D. Park, W.J. Jung (2011) Enzymatic production of chitin from crustacean shell waste IN *chitin chitosan, oligosaccharides and their Derivatives*, Se-Kwon Kim, CRC Press Taylor & Francis Group; pp. 37-43.
- Jun HK, Kim JS, No HK, Meyers SP : Chitosan as a coagulant for recovery of proteinaceous solids from tofu waste-water. J Agric Food Chem, 1994, 42(8) :1834-1838.

- Jung W.J., G.H. Jo, Kuk, Y.J. Kim, K.T. Oh, R.D. Park (2007) Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with Lactobacillus paracasei KCTC-3074 and Serratiamarcescens FS-3. Carbohydrate Polymer, 68, 746-750.
- Jalal Zohuriaan-Mehr M., Advances in Chitin and Chitosan Modification through Graft Copolymerization, Iranian Polymer Journal 14 (3), (2005) 235-265.
- JAK Winterowd G and. A. Paul. Sandford, chitin and chitosan ,etited by Alistair. M. Stephen. Food polysaccharides and their application. Edition marcel.Dekker. Newyork.1995.

-K-

- Karne Le Roux. (2012). Thése De Doctorat : Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevette penaeusvannamei. Caractérisations des roduits et optimisation du procédé.
- Kim S-k : Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and TheirDerivatives : Biological Activities and Applications CRC press ; 2010
- Knorr D. Use of chitininous polymers in food. Food Technol.38 (1984) ,85
- Kurita K. Marine Biotechnol 8 (2006) 203.
- Klokkevold PR., Fukayama H., Sung EC., (1999)- The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery Volume 57, Issue 1, January 1999, Pages 49-52.
- Khan, T. A., Peh, K. K., et C'ing. Mechanical bioadhesive strength and biological evaluation of chitosan films for wound dressing. Journal of Pharmaceutical and pharmaceutical science, 3(3), H.S. (2000) 3003-3371.
- Kurita K. Marine Biotechnol 8. 2006. 203.

-L-

- Laura Ramírez- Coutiño, María del Carmen Marín- Cervantes, Sergio Huerta, Sergio Revah and KeikoShirai, 2006. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicilliumfungicola*chitinases. ProcessBiochemistry, 41, 1106-1110.
- Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, FrondozaCG :Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoplasts and chondrocytes. J Biomed Mater Res, 2000, 51(4) : 586-595

- Lebouc, F., et al. ‟Different ways for grafting ester deratives of poly (ethylene glycol) onto chitosan : related characteristics and potential properties. ‟polymers 46.3 (2005) : 639-651.
- Lebouc, F., et al. ‟Synthesis of phosphrus-containing chitosane derivative.”phosphorus,sulfate, and silicon. Taylor and francis 184.4 (2009) : 872-889.
- Lee, Y. S., Park, R. D. &Rhee, C.O. (1999). Effect of chitosan treatment on growing characteristics of soybean sprouts. Korean J Food ScTechnol, 31,153-157.
- Lévesque, M., Extraction de caractérisation de la chitine des résidus de la transformation industrielle des crustacés, Mémoire de maitrise, Université Laval. 1995.
- Li JM., MengXG., Hu CW., Du J., (2009)- Adsorbtion of phenol, p-chlorophenol and p-nitropheno onto functional chitosan. Bioresourcetechnology, 2009- Elsevier
- Lee K.Y., Ha W.S., et Park W.H., 1995- Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives, Biomaterials, Vol(16)., p.p.1211-1216.
- Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG (2000)- Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. mercury ions. J ChilChemSoc, 2000, 48(1), 7-12.
- Lius C. A., S. Huerta, G.M. Hall, K. Shirai (2002) pilot Scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. Process Biochemistry, 37, 1359-1366.
- Laflamme P, N. Benhamou, G. Bussières, M. Dessureault (1999) « Differentiel effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries », Canadian Journal of Botany, 77, 1460-1468

-M-

- Mahmoud N.S., A.E. Ghaly and F. Arab (2007) Uncoventionalappraoch for demineralization of deproteinized crustacean shells for chitin production. American Journal of Biotechnology, 3, 1-9.
- Messaoud Touatia, (2016). Constribution à la purification de la chitine à partir des coproduits de la crevette rouge Artisteuranennatus (Risso, 1816). UniversitéAbdelhamideIbnBadis-Mostganem.
- Minagawa T, Okamura Y, Shigemasa Y, Minami S, Okamoto Y : Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitine /chitosan on wound healing. CarbohydrPolym 2007, 67(4) : 640-644

- Morfin I., Hazot P., Guillot F., Soler C., Korwin-Zimijowka C., Tahiri K., Chevalier X., Corvol M. and Domard A., 2002. Percolating hydrogels for tissue engineering. Europ. Cells and Materials, 4. Suppl., 55-56.
- MR. Kasaai. J. Arul, G. Charlet. J PolymSciPolymPhys 38. 2000. 2591.
- Muzzarelli R, A, A. chitine :Pergamom : Oxford, 1977.
- Muzzarelli R, A, A., ed. London : Academic Press 3 (1985). 417.
- MW. Anthonsen, KM. Varum, O. Smidsrod. Carbohdr Res 246. 1993. 331
- MaletteWG., Quigley HJ., Gaines RD., (1983) - Chitosan: A New Hemostatic The Annals of Thoracic Surgery. Volume 36, Issue 1, July 1983, Pages 55-58.
- Muzzarelli R .A .A.,Muzzarelli C., Tarsi R., Miliani M.,Gabbanelli F and CartolariM.Fungistatic activity of modified chitosans against Saprolegniaparasitica.Biomacromolecules. (2) 165-169, 2001.

-N-

- Nadarajah, K., et al. « Sorption behavior of crawfish chitosan films as affected by chitosan exeractionpricesses. » Journal of food Science 71.2 (2006) : 33-39.
- Narayanan N., Roychoudhury P and Ssrivastava A., 2004 – L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization . Electronic journal of biotechnology : 2p.
- No H. K., Cho Y. I., Kim H. R. et Mayers S. P., (2000)- Effective dacetylation of chitine under conditions of 15psi/121℃. Journal agric. Food chem. 48, 2625-2627.
- No,H.K., Meyers S. P., J. Aquatic Food Prod. Iech., 4, (1995) 27.
- No, H. K., Meyers S. P, and lee. K.S., J. Agric. Food Chem.37 (1989) 575.
- No H K, Meyers SP : Application of chitosan for treatement of wastewaters. In : Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. New York : Springer-Verlag ; 2000 : 1-27
- Nokano Y, Bin Y, Bando M, Nakashima T, Okuno T, Kurosu H, Matsuo M : structure and mechanical properties of chitosane/poly(vinyl alcohol) blend films. Macromolecular symposia, 2007, 258 :63-81
- No H. K,. Park N. Y,. Lee S. H, S. P. Meyers (2002) « Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weight », International Journal of Botany, 77, 1460-1468.
- Norseth T, The carcinogenicity of chromium. Environ. Health. prespect, 15, (1981), 255-270.

- Norseth T, The carcinogenicity of chromium. Environ. Health. prespect, 15, (1981), 255-270.

-O-

- Ouattara.B, Simard R., Piette G,.Bégin A,.Hollyey R A (2000) « Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan », International Journal of Applied Polymer Science, 79, 1324-1335.
- Onsoyen E. Skaugrud O. J. chemTechnolBiotechnol P49 (1990) 395.

-P-

- Paesar P S., Kennedy J F., Gandhi D N and Bunko k., 2007 – Piotilization of whey for acid lactic production. Divition of dairy microbiology. National diary research institute : pp18-20.
- Percot, A., Viton, C., Domard, A., Optimization of Chitin Extraction from shrimp Shells, biomacromolecules,2002, 4 (1), 12-18.
- Percot, A.,Viton, C., Domard, A., Caractérisation of shrimp shell deproteinization, Biomacromolecules, 2003, 1380-1385.
- PR. Austin. Chitin solvents and solubility parameters in : chitin and chitosane and related enzymes. Zikakis IP, ed. Orlando : Academic Press. 1984. 227.
- Peter M. G. Biopolym., 6 (2002) 481.
- Peng Y, B. Han, W. Liu, X. Xu (2005) « Preparation and antimicrobial activity of hydroxypropyl chitosan », Carbohydrate research, 340, 1846-1851.
- Plouffe B., 1997. Production de chitosanases modulaires munies d'un site d'attachement à la cellulose et étude de leur activité en bioréacteur. Mémoire de Maîtrise en Sciences (M. Sc.). Université de Sherbrooke, Canada.

-R-

- Ravallec-Plér., 2000. Valorisation d'hydrolysats d'origine marine ; optimisation de la concentration en peptides apparentés aux facteurs de croissance et aux agents sécrétagogues. ThéseMédVét : Université de Bretagne Occidentale, 171 pp.
- Rhee JS, Jung MW, PaengKJ : Evaluation of chitin and chitosan as a sorbent for the preconcentration of phénol and chlorophenols in water. Anal Sci, 1998, 14(6) : 1089-1092
- Ribeiro MP, Esoiga A, Silva D, Baptista P, Henriques J, Ferreira C, Silva JP, Pires E, Chaves P et al :Developement of a new chitosane hydrogels for wound dressing. Wound Repair Regen, 2009, 17(6) :817-824

- Rao M. S., Munoz J. and Stevens W. F., 2000. Critical factors in chitine production by fermentation of shrimp biowaste.Appl. Microbiol. Biotechnol.54, 808-813.
- Rinaudo M. ProgPolymSci 31 (2006) 603.
- Rinaudo L,. Morin F.G, .Marchessault R.H. Cahbohydr Res 340. 2005. 1914.
- Ruiz, Montserrat, Ana Maria Sastre, and Eric Guibal. ‟Palladium sorption on glutaraldehyde-cross linked chitosan.” Reactive and Functional Polymers 45.3 (2000) : 155-173.
- Rao S.B. et Sharma C.P., (1997)- Use of chitosan as a biomaterial : studies on its safety and hemostatic potential., J Biomed Mater Res., Vol(34).,p.p. 21-28.
- Rao S B and Sharma C P. Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. Journal of Biomedical Materials Research. (34) 21-28, 1997.
- Rinaudo M,. Pavlov G,.Desbriéres J. Poly 40.1999.7029.

-S-

- Sano H. Matsukbo T., Shibasaki K., Itoi H., Takaesu Y, Bull. Tokyo dent. 32, (1991) 9.
- Senel S., et McClure S., Advanced Drug Delivery Reviews 56, (2004) 1467.
- Senel S, McClure SJ : Potential applications of chitosan in veterinary medicine. Advanced
- Shahidi F, Arachchi JKV, JeonYJ : Food application of chitin and chitosanes. Tends Food SciTechnol, 1999, 10(2) : 37-51
- Sini T.K., S. Santhosh, P.T. Mathew (2007) Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using bacillus subtilis fermentation. Carbohydrate Research, 42, 2423-2429.
- Skorik YA, Pestov AV, YatlukYG : Evaluation of various chitin- glucan derivatives fromAspergillusniger as transition metal adsorbents. BioresourTechnol, 2010,101(6) : 1769-1775
- Sorlier P, Denuziere A, Viton C, DomardA : relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitine and chitosan . biomacromolecules, 2001,2(3) : 765-772
- Sorlier P, Rochas C, MorfinI,Viton C, Domard A : Light scattering studies of the solution properties of chitosans of varying degrees of acetylation. Biomacromolecules.2003, 4(4) :1034-1040

- Shi C., Zhu Y., Ran X., Wang M., Su Y and Cheng T. Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine. Journal of Surgical Research. (133)185-192, 2006.
- Roller S, N. Covill (1999) « The antifungal properties of chitosane in laboratory media and apple juice », Internationnal journal of food Microbiology, 47, 67-77.
- Sorokulova I., A. Krumnow, L. Globa, V. Vodyanoy (2009) Efficient decomposition of shrimp shell waste using Bacillus cereus and Exiguobacteriumacetylicum. Joumaof industrial Microbiology and Biotchnology,36,1123-1126.
- Synowiecki, J., and Al-kateeb, N. A.A.Q. ‘’The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin From Shrimp Cragoncrangon processing discards. ‘’Food chemestry68. 2 (2000) : 147-152.
- Synowiecki, J., Al- khateeb, N., Production, propriétés, and some new applications of chitin and its deratives, Critical Revien in Food Sciences and Nutrition, 2003, 43(2), 145-171.
- Shimahara K,.Takiguchi Y. Preparation of crustacean chitin in : Methods in enzymology. Wood WA, Kellog ST, eds, New York : Academic Press 161. 1998. 417

-T-

- Tae-Hee Kim, Hu-Lin Jiang, DhananjayJere, In-Kyu Park, Myung- Haing Cho, Jae-Woon Nah, Yun-Jaie Choi, Toshihiro Akaike, Chong- Su Cho. (2007)-Chemical modification of chitosane as a gene carrier in vitro and in vivo. Review Article Progress in Polymer Scienc, 2007, 32(7), 726-753.
- Taboada E, Cabrera G, Cardenas G : Retention, Capacity of chitosan for copper and mercury ions. *J ChilChemSoc*, 2003, 48(1) : 243-248
- Takeuchi H., yamamoto H., Niwa T., Hino T., Kawashima Y., Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coeted liposomes. Pharm. Res.,13, 896 (1996).
- Tsai G., Tsai M., Lee J., et Zhong M., J Food Prot 69 (2006) 2168.
- Tolaimate A., J. Desbières, M. Rhazi, A. Alagui, M. Vincendon, P. Vottero (2000) On theinfluence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. Polymer, 41, 2463–2469.

-U-

- Ueno H., Mori T and Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. Advanced Drug Delivery Reviews. (52) 105-115, 2001

-V-

- Vàzxuez, josé Antonio, et al. « chiondroit in sulfate hyaluronic acide and chitin/ chitosan Production using marine waste sources : A revient. « Marine drugs 11.3 (2013) :747-774.

-W-

- Wing S.L. and S. H. chio (1998).Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of Pseudomonas aeruginosa K-187. Enzyme Microbial and Biotechnology, 22, 629-633.
- Wing S.L., T.Y. Kao, C.L. Wang, Y.H. Yen, M.K. Chern, Y.H. Chen (2006) A solvent Stable metalloprotease produced by *Bacillus* sp. TKU004 and its application in the deproteinization of squid pen for β-chitin preparation.Enzyme Microbial and Technology, 39, 724-731.
- Winterowd JG, Sandford PA., ed Marcel Dekker 13 (1995) 441.
- Wang W., Et D. Xu. Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degree of deacetylation , Int. J. Biol. Macromol., 16(3) .1994.,49-152.
- Wu T., Svetlana Zivanivic, F. Ann Draughon, Carl E. Sams (2004) Chitin and chitosanvalue-added products from mushroom waste. Journal of agricultural and food chemistry, 52,7905- 7910.

-X-

- Xuan Jiang, Lirong Chen, Wei Zhong : A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosane . Carbohydrate Polymers 54 (2003) 457-463.

-Y-

- Yamada, A. Shibuya, Kodama, O. &Katsuka, T.A.(1993). Introduction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetyl chtooligosaccharides, Bioscience, Biotechnological Biochemistry, 57, 405 – 409.
- Yap J, Isa MH, KuttySMR : Removal of colour from textile wastewater using oil palm ash. 2008.
- Yang T .S., Chou C .C,. Li CF (2005). « Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives », International Journal of food Microbiology, 97, 237-245.

-Z-

- Zhang Z Y., Jin B and Kelly J M., 2007 – Production of lactic and from renewable materials by *Rhizopus* fungi. Biochemical engineering Journal :35 : pp 251-263.
- Zhenwang. L, Zhenlu. C ,Jianyan.L, The PT dye molecular structure and its chromophoricluminescences mechanism, Rome : 15th World Conference on Non-Destructive Testing,(2000).

- Zhenwang. L, Zhenlu. C ,Jianyan.L, The PT dye molecular structure and its chromophoricluminescences mechanism, Rome : 15th World Conference on Non-Destructive Testing,(2000).

1. Matériel et Méthode

Verrerie	Appareillage	Produits
Béchers	Balance de précision	Biomasse (crevettes brutes)
Erlenmeyer	Plaque chauffante.	$CaCl_2$
Eprouvettes gradués	pH mètre	NH_4Cl_2
Fioles	Etuve	NaOH
Spatule, capsule	Incubateur agité.	Tween 80
Boite de Pétri	Autoclave.	MRS
Pipettes pasteur	Microscope optique	Agar agar
Ecouvillon	Spectroscopie FT-IR.	Eau distillée
Lame et lamelle	Bec bunsen	
Entonnoir		
Flacons		
Tubes essaies		

2. Préparation de MRS liquide

– Pesez 26.125g de poudre de MRS ;

–Mélanger avec l'eau distillée 500 ml ;

–Faire dissoudre par chauffage et son agitation ;

–Laisser bouillir pendant une minute ;

–Distribuer 10 ml dans des tubes essai ;

–Stériliser à 120°C pendant 10 mn.

Remarque

Pour la préparation de MRS solide ajoutez 10g d'agar agar et chauffer.

3. Préparation de solution de NaoH

Eau distillée	500 ml
NaoH	250g